

**Der Einfluss einer CYP2B-Induktion durch Phenobarbital auf
die CYP3A1-Induzierbarkeit in vitro durch Dexamethason
in Rattenleberschnitten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Sabine Hempel
geboren am 27.12.1981 in Mühlhausen/Thüringen

Gutachter

1. PD Dr. med. Reinhild Glöckner, Jena
2. PD Dr. med. dent. habil. Florentine Jahn, Jena
3. Prof. Dr. med. Heidi Foth, Halle/Saale

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.05.2013

Widmung

Gewidmet meiner Mutter in Liebe und Dankbarkeit.

Abkürzungsverzeichnis

AhR	Aryl-hydrocarbon-Rezeptor
BNF	Beta-Naphthoflavon
CAR	Constitutive Androstane Receptor
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CO	Kohlenmonoxid
CYP	Cytochrom-P450
Dex	Dexamethason
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ER	endoplasmatisches Retikulum
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IS	Interner Standard
KH-Puffer	Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NR	nukleäre Rezeptoren
PB	Phenobarbital
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PROD	7-Pentoxoresorufin-O-Depentylierung
Prot.	Protein
PXR	Pregnane-X-Rezeptor
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
TCA	Trichloressigsäure
TCDD	Tetrachlordibenzodioxine
TH	Testosteronhydroxylierung
WME	Williams' Medium E

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung	10
2.1. Die Biotransformation	10
2.2. Das CYP-System	11
2.3. Die Induktion von CYP	13
2.4. CYP3A und dessen Induktionsmechanismus	14
2.5. Modelle zur Untersuchung der CYP-Induktion	17
2.5.1. In-vivo-Modelle	17
2.5.2. In-vitro-Modelle	17
2.6. CYP3A-Induktion in Präzisionsleberschnitten	20
3. Zielstellung	23
4. Material und Methoden	25
4.1. Versuchstiere	25
4.1.1. Haltung der Versuchstiere	25
4.1.2. Vorbehandlung der Versuchstiere	25
4.2. Schnittpräparation	25
4.3. Inkubation der Leberschnitte	26
4.4. Versuchsdesign	27
4.5. Bestimmung der Biotransformationsaktivität	29
4.5.1. Bestimmung des Proteingehalts als Bezugsgröße	29
4.5.3. 7-Pentoxoresorufin-O-Depentylierung (PROD)	31
4.6. Bestimmung der CYP3A1-mRNA-Expression	32
4.6.1. RNA-Isolation aus Lebergewebe	32
4.6.2. Bestimmung der RNA-Konzentration (OD) und –reinheit	33
4.6.3. Die RT-PCR	33
4.6.3.1. Die RT	34

4.6.3.2.	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
4.6.3.3.	Die kompetitive RT-PCR.....	35
4.6.4.	Elektrophorese der RT-PCR-Produkte.....	35
4.7.	Statistik.....	36
5.	Ergebnisse	37
5.1.	CYP3A1-Induktion in vitro durch Dex in Leberschnitten unbehandelter Ratten	37
5.2.	CYP3A1-Induktion in vitro durch Dex in Leberschnitten PB-vorbehandelter Ratten	38
5.2.1	Kontrolle des PB-Effekts: PROD-Aktivität	38
5.2.2.	Beeinflussung der CYP3A1-Aktivitäten	39
5.2.3.	Beeinflussung der CYP3A1-mRNA	40
5.3.	Einfluss von PB in vitro auf die CYP3A1-Induktion durch Dex in Leberschnitten unbehandelter Ratten	41
5.3.1.	Dex-Exposition in vitro gleichzeitig mit PB	41
5.3.1.1.	Kontrolle des PB-Effekts (5 und 100 μ M): PROD-Aktivität.....	41
5.3.1.2.	CYP3A-Induktion bei Kombination von Dex mit 5 μ M PB	43
5.3.1.2.1.	Beeinflussung der CYP3A1-Aktivitäten	43
5.3.1.2.2.	Beeinflussung der CYP3A1-mRNA	44
5.3.1.3.	CYP3A-Induktion bei Kombination von Dex mit 100 μ M PB	45
5.3.1.3.1.	Beeinflussung der CYP3A1-Aktivitäten	45
5.3.1.3.2.	Beeinflussung der CYP3A1-mRNA	46
5.3.2.	Dex-Exposition in vitro nach vorangegangener PB-Exposition	47
5.3.2.1.	Kontrolle des PB-Effekts (5 und 100 μ M): PROD-Aktivität.....	47
5.3.2.2.	CYP3A-Induktion bei Kombination von Dex mit 5 μ M PB	49
5.3.2.2.1.	Beeinflussung der CYP3A1-Aktivitäten	49
5.3.2.2.2.	Beeinflussung der CYP3A1-mRNA.....	50
5.3.2.3.	CYP3A-Induktion bei Kombination von Dex mit 100 μ M PB	51

5.3.2.3.1. Beeinflussung der CYP3A1-Aktivitäten	51
5.3.2.3.2. Beeinflussung der CYP3A1-mRNA	52
6. Diskussion	53
6.1. CYP3A1-Induktion in vitro durch Dex in Leberschnitten unbehandelter Ratten	53
6.2. CYP3A1-Induktion in vitro durch Dex in Leberschnitten PB-vorbehandelter Ratten	56
6.3. Einfluss von PB in vitro auf die CYP3A1-Induktion durch Dex in Leberschnitten unbehandelter Ratten	61
6.3.1. Einfluss der Dex-Exposition in vitro gleichzeitig mit PB	62
6.3.2. Einfluss der Dex-Exposition in vitro nach vorangegangener PB-Exposition	65
7. Schlussfolgerungen	69
8. Literaturverzeichnis	70
9. Anhang	82
Danksagung	
Lebenslauf	
Ehrenwörtliche Erklärung	

1. Zusammenfassung

Das Ziel der Untersuchungen war herauszufinden, ob eine Vorinduktion von Lebergewebe einen Einfluss auf anschließend durchgeführte CYP-Induktionsversuche in vitro mit Präzisionsleberschnitten hat. Dies ist besonders dann wichtig, wenn humanes Material verwendet werden soll, bei dem durch Medikamente, Ernährung, Lebensgewohnheiten usw. schon eine Induktion in vivo stattgefunden hat.

In der vorliegenden Dissertation wurde der Teilaspekt einer CYP3A1-Induktion in vitro durch Dexamethason (Dex) nach vorangegangener oder gleichzeitiger CYP2B-Induktion durch Phenobarbital (PB) an Präzisionsleberschnitten 40 Tage alter weiblicher Ratten erforscht. Die Versuchsanordnung gliederte sich in In-vivo-in-vitro-Experimente, bei denen die Tiere vor der Leberentnahme an 3 aufeinanderfolgenden Tagen durch intraperitoneale Injektion von 60 mg PB/kg Körpermasse behandelt wurden, um anschließend die CYP3A1-Induktion über 24 Stunden in vitro durchzuführen, und reine In-vitro-Versuchsreihen mit simultaner und sukzessiver Einwirkung von Dex und PB. Die hierbei eingesetzten PB-Konzentrationen von 5 und 100 μM stehen repräsentativ für schwache und starke CYP2B-Induktoren, die Dex-Konzentrationen betrugen 0,01, 0,1, 0,5 und 1 μM . Die CYP3A1-Induktion wurde sowohl auf der Ebene der messenger RNA (mRNA) mittels RT-PCR als auch auf Enzymaktivitätsebene mittels 2 β - und 15 β -Testosteronhydroxylierung (2 β -, 15 β -TH) nachgewiesen. Der PB-Effekt wurde durch die 7-Pentoxoresorufin-O-Depentylierung (PROD) kontrolliert.

Die bekannte konzentrationsabhängige Steigerung der CYP3A1-Aktivität durch Dex in vitro in Präzisionsleberschnitten wurde bestätigt. Nach 24-stündiger Exposition löste 1 μM Dex eine 17-fache Erhöhung der 2 β -TH und eine 8-fache Erhöhung der 15 β -TH gegenüber der Kontrollgruppe aus.

Erwartungsgemäß führte die PB-Vorbehandlung zu einer ca. 40-fachen Steigerung der CYP2B-abhängigen PROD und ca. 4-fachen Erhöhung der CYP3A-abhängigen 2 β - und 15 β -TH, die in den anschließend gewonnenen Leberschnitten während der 24-stündigen Inkubation unvollständig abklangen. Durch Dex-Exposition in vitro wurde eine konzentrationsabhängige CYP3A-Induktion sowohl auf Aktivitäts- als auch auf mRNA-Ebene ausgelöst. Dabei wurden etwa doppelt so hohe TH-Aktivitäten bei etwas geringeren mittleren Induktionsfaktoren als in Leberschnitten unbehandelter

Versuchstiere erreicht, ohne dass sich die spezifischen mRNA-Konzentrationen unterschieden.

Die gleichzeitige Einwirkung von Dex und PB in vitro behinderte die CYP3A-Induzierbarkeit nicht. Weder 5 noch 100 μ M PB hatten eine nennenswerte Eigenwirkung auf die 2 β - und 15 β -TH und deren Induzierbarkeit durch Dex trotz unterschiedlicher Effekte auf die CYP2B-abhängige PROD (keine Induktion mit 5 μ M PB allein, Steigerung in allen Gruppen mit 100 μ M PB). Durch beide PB-Konzentrationen wurde die CYP3A1-mRNA-Induktion nicht beeinträchtigt.

Die sukzessive Einwirkung von Dex nach PB in vitro auf Leberschnitte ergab ähnliche CYP3A1-Aktivitäten wie bei alleiniger Dex-Exposition, allerdings mit etwas geringerer Steigerung durch 1 μ M Dex. Die erzielten Induktionsfaktoren lagen im gleichen Bereich wie nach In-vivo-Vorinduktion der Spenderlebern mit PB. Es war keine Eigenwirkung von 5 und 100 μ M PB auf die 2 β - und 15 β -TH zu verzeichnen. Der PB-Effekt auf die PROD, der erwartungsgemäß nach 100 μ M, nicht aber nach 5 μ M PB auftrat, war 24 Stunden nach Expositionsende noch nicht völlig abgeklungen. Auch die Induzierbarkeit der CYP3A1-mRNA durch Dex in vitro war nach beiden PB-Konzentrationen uneingeschränkt nachweisbar. In den untersuchten Stichproben ließ sich kein nennenswerter PB-Einfluss erkennen.

Aus den Untersuchungsergebnissen geht hervor, dass sowohl auf der Aktivitäts- als auch auf der mRNA-Ebene die In-vitro-Testung potentieller CYP3A-Induktoren in Präzisionsleberschnitten trotz vorheriger oder gleichzeitiger CYP2B-Induktion durch PB uneingeschränkt möglich ist und der Dex-Effekt nicht maskiert wird. Prinzipiell ist somit auch Gewebe für die Verwendung bei CYP3A-Induktionsversuchen geeignet, wenn sein Expressionszustand zuvor durch Einwirkung von CYP2B-Induktoren moduliert wurde, was bei Verwendung humanen Materials zutreffend sein kann. Auch die Prüfung CYP3A-induzierender Eigenschaften von Substanzen, die gleichzeitig CYP2B-induzierend wirken, ist möglich.

2. Einleitung

2.1. Die Biotransformation

Zum Stoffwechsel von Lebewesen gehört die Biotransformation. Sie dient der Überführung körperfremder Substanzen (Xenobiotica) und endogener Stoffwechselprodukte in ihre ausscheidbare Form, vor allem, wenn sie aufgrund hoher Lipophilie nicht direkt über die Nieren und die Leber ausgeschieden werden können. Die Leber ist das zentrale Organ der Biotransformation (Gillette 1963, Aktories et al. 2009). Aber auch Dünndarmschleimhaut, Lunge und Niere sind, wenn auch mit geringerer Kapazität, beteiligt (Meyer 1996). Selbst in Pflanzen und Mikroorganismen, z. B. in darmflorabildenden Bakterien, wurden diese Enzymgruppen nachgewiesen (Fukuda et al. 1993, Alekseeva 2004).

Die Biotransformation wird in zwei Phasen eingeteilt. Während der Phase-I-Reaktionen, auch Funktionalisierungsreaktionen genannt, werden Ausgangsverbindungen durch die Demaskierung oder Einführung funktioneller Gruppen (z.B. -OH, -SH, -NH₂ und -COOH) oxidativ, reduktiv oder hydrolytisch verändert. Um die Ausscheidung der so entstandenen Intermediärprodukte zu gewährleisten, erfolgt in den Phase-II-Reaktionen die Konjugation mit wasserlöslichen, polaren Gruppen (Glucuronidierung, Sulfatierung, Amidierung, Acetylierung usw.), was die Löslichkeit in Urin und Faeces verbessert. Die Biotransformation ist nicht als reines Entgiftungssystem anzusehen. Die Wirkung einiger Medikamente, sogenannter Prodrugs, beispielsweise wird erst durch Phase-I-Reaktionen entfaltet oder verstärkt. Andererseits ist auf jeder Stufe der Biotransformation auch die Entstehung toxischer Metabolite möglich und wird als Giftung bezeichnet (Yamazaki et al. 1995, Constan et al. 1999, Eichelbaum und Burk 2001).

Die CYP-abhängigen Monooxygenasen sind das wichtigste Enzymsystem der Phase-I-Reaktionen und Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Dissertation. Bei Säugern sind etwa 90 bis 95 % der CYP in der Leber lokalisiert. Auch in Organen wie den Nieren, der Lunge und der Haut sind CYP vertreten. Die CYP im Darm machen immerhin 1 bis 2 % des Gesamtbestandes aus.

2.2. Das CYP-System

Die Superfamilie der CYP wurde 1958 von Klingenberg und Garfinkel unabhängig voneinander entdeckt und als CO-bindendes Pigment der Lebermikrosomen von Säugetieren beschrieben. 1991 wurde von Nebert et al. die Nomenklatur der Superfamilie mit der Abkürzung CYP empfohlen. Die Bezeichnung P450 basiert auf der lichtabsorbierenden Eigenschaft der prosthetischen Gruppe, dem Hämin, in reduzierter Form (Fe^{2+}) mit Absorptionsmaximum (P entspricht peak, Spitze) bei einer Wellenlänge von 450 nm in Gegenwart von CO. Bei den CYP handelt es sich um Hämoproteine, die aus circa 500 Aminosäuren bestehen und ein Molekulargewicht von 45 bis 55 kD besitzen. Bei Säugetieren sind sie in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien lokalisiert.

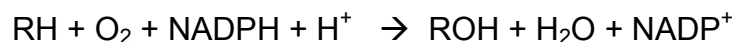
Ein einheitliches Nomenklatorsystem zur Unterteilung der CYP wurde 1987 von Nebert et al. eingeführt und basiert auf der Homologie der Aminosäuresequenz. Bei $\geq 40\%$ iger Übereinstimmung der Primärstruktur erfolgt die Zuordnung zu einer Genfamilie, die durch die erste arabische Ziffer bezeichnet wird. Stimmt die Aminosäuresequenz von Enzymen zu $>55\%$ überein, so bilden diese eine Subfamilie und werden mit einem Großbuchstaben markiert. Bei Mäusen sieht die Nomenklatur die Verwendung von Kleinbuchstaben für die Subfamilien vor. Eine zweite arabische Ziffer dient der Bezeichnung der Isoenzyme innerhalb dieser Unterfamilien (Gonzalez 1989, Nelson 1996). Die Bezeichnung CYP3A1 beispielsweise steht für das erste Isoenzym, welches in der Subfamilie A der Genfamilie 3 entdeckt wurde.

Die CYP interagieren mit verschiedenen Cofaktoren, um ihre volle Leistungsfähigkeit entfalten zu können. Die charakteristische Funktion der Monooxygenasen ist die Übertragung eines Sauerstoffatoms auf das Substrat. Der Ablauf der Reaktion kann in 4 Einzelschritte untergliedert werden:

- Das im Molekülzentrum des Hämins gebundene Eisen liegt vorerst in der oxidierten Form vor (Fe^{3+}), woraus eine geringe Sauerstoffbindungsfähigkeit resultiert. Durch Bindung des Substrates wird das Eisen in einen energetisch höheren Zustand überführt (high spin-Form).

- Im nächsten Schritt erfolgt die Übertragung eines Elektrons von Nicotinamid-adenindinukleotidphosphat (NADPH) auf das Eisen, wobei dieser Transfer durch die CYP-Reduktase katalysiert wird. Das Eisen wird zu Fe^{2+} reduziert.
- Das so entstandene Häm kann nun durch erhöhte Affinität zu Sauerstoff den molekularen Sauerstoff als $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ -Komplex binden.
- Für den letzten Reaktionsschritt wird erneut ein Elektron von Coenzymen (entweder Cytochrom b5 oder CYP-Reduktase) auf CYP übertragen, wobei der hochreaktive $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2^-$ -Komplex entsteht. Eines der Sauerstoffatome wird auf das Substrat übertragen und das zweite zu Wasser reduziert. Das Substrat kann nun in Phase-II-Reaktionen der Biotransformation mit reaktiven Gruppen versehen werden.

Zusammenfassend kann der vierschrittige Prozess mit folgender Formel zum Ausdruck gebracht werden:



Bisher wurden bei Säugern 14 CYP-Gen-Familien nachgewiesen, die je nach Spezies und Gewebe unterschiedlich verteilt sind. Speziell für den Menschen sind die Familien CYP 1 bis 3 für die Biotransformation von Xenobiotica bedeutungsvoll. CYP3A4 stellt sowohl quantitativ mit einem Anteil von 30% die größte Fraktion der Isoenzyme dar, es metabolisiert auch ca. zwei Drittel der aufgenommenen Fremdstoffe.

Die Animal-Plant-Warfare-Hypothese geht davon aus, dass pflanzenfressende Spezies ein protektives Enzymsystem zum Schutz vor schädlichen Substanzen aus Nahrungspflanzen entwickelten (Efferth 2006, Gonzalez und Nebert 1990). Die Bildung von Fraßgiften und die jeweilige Anpassung der Konsumenten sind als ein Rüstungswettlauf um die bessere Überlebenswahrscheinlichkeit anzusehen. Die inter- und intraspezifische Variabilität der Enzymausstattung, der Polymorphismus, konnte beim Auftreten neuer Substanzen zu einer Selektion der zufällig gut angepassten Individuen führen. Nach der Entwicklung zahlreicher Medikamente, Nahrungsergänzungsmittel und anderer Xenobiotica ist die Bedeutung der CYP weit über ein reines Abwehrsystem gegen Pflanzengifte hinausgewachsen.

2.3. Die Induktion von CYP

Um sich an die verschiedenen Umwelteinflüsse anpassen zu können, entwickelte sich in der Evolution ein dynamisches Enzymsystem. Wird der Organismus zum Beispiel mit hohen Konzentrationen eines potentiell schädlichen Xenobiotikums konfrontiert, muss er auf einen solchen Einfluss schnell reagieren können. Die in Abwesenheit des Substrates relativ geringe basale Expression des entsprechenden Isoenzyms kann durch Induktion um ein Vielfaches gesteigert werden. Dieser Prozess verläuft zumeist dosisabhängig, schnell, gewebespezifisch und ist bei Ausbleiben des Substrates reversibel (Handschin und Meyer 2003).

Die Modulation der Genexpression findet bei CYP auf der Ebene der Transkription statt, dies führt zu einer vermehrten bzw. verminderten Bildung von CYP-mRNA und schließlich zum stoffwechselaktiven Enzym. Häufig induzieren Medikamente und andere Xenobiotika die CYP, die an ihrer Elimination beteiligt sind. Das CYP3A1-Gen enthält Regulationsregionen, die durch Interaktion mit ligandengebundenen Kernrezeptoren die Stärke der Expression steuern.

Bei der Forschung am CYP-System der Rattenleber kristallisierten sich fünf Induktorklassen heraus, die 1996 von Parkinson mit den dazugehörigen charakteristischen Reaktionen tabellarisch dargestellt wurden (Tabelle 2.1.). Für die vorliegende Arbeit sind davon der Dex- und der PB-Typ relevant.

Tabelle 2.1.: Induktorklassen für CYP in Rattenlebern nach Parkinson (1996), modifiziert

Induktorklassen mit jeweiligen Modellinduktoren	hauptinduzierbare CYP-Enzyme
3-Methylcholanthren, β - Naphthoflavin, TCDD ¹ , planare PCB ²	CYP1A1 und 1A2
Phenobarbital, Antioxidantien, Antihistaminika, nonplanare PCB ²	CYP2B1 und 2B2
Dexamethason, PCN ³ , Troleandomycin	CYP3A1 und 3A2
Isoniazid, Pyrazole, Ethanol, Aceton	CYP2E1
Clofibrat und andere Peroxisom-Proliferatoren	CYP4A1, 4A2 und 4A3

¹ Tetrachlordibenzodioxine, ² Polychlorierte Biphenyle, ³Pregnenolone-16 α -carbonitril

2.4. CYP3A und dessen Induktionsmechanismus

Bedeutung der CYP3A-Subfamilie

Da die CYP3A-Isoenzyme am Metabolismus von 50 bis 60 % der auf dem Markt befindlichen Arzneimittel beteiligt sind (Li et al. 1995; de Wildt et al. 1999), können sie als vorherrschende Subfamilie bezeichnet werden (Guengerich 1999; Lee und Goldstein 2005). Ein Modellinduktor für CYP3A ist Dex, weshalb Parkinson den Begriff Dex-Typ einführte (Parkinson 1996).

Die CYP3A-Subfamilie metabolisiert zahlreiche Medikamente unterschiedlicher Stoffklassen. Hieraus resultiert ein Potential von Medikamenteninteraktionen, die sowohl bei einer Hemmung als auch bei einer Steigerung der Enzymaktivität auftreten können. Erwähnenswert ist beispielsweise die suppressive Wirkung des Ketoconazols auf die CYP3A-Expression. Bei gleichzeitiger Gabe von Cyclosporin A muss dessen Dosis um 75% reduziert werden, um übermäßige Toxizität durch verminderten Abbau zu verhindern. Hingegen ist eine Dosissteigerung des Immunsuppressivums bei gleichzeitiger Gabe von Rifampicin nötig, da es induktiv wirkt. Das bekannteste Beispiel für den Einfluss eines Nahrungsmittels auf das CYP-System ist die inhibitorische Wirkung von Grapefruitsaft auf CYP3A. Dieser Effekt hält für 24 bis 48 Stunden an.

Speziesunterschiede zwischen Mensch und Ratte

Eine direkte Übertragung zahlreicher Untersuchungsergebnisse aus Tierversuchen auf den Menschen als „Zielspezies“ ist nicht ohne weiteres möglich, was an folgenden Beispielen belegt werden soll. Rifampicin ist beim Menschen als starker CYP3A-Induktor bekannt, weist jedoch bei Ratten kaum eine CYP3A-induzierende Wirkung auf. Hingegen wurde für Dex sowohl bei Menschen als auch bei Ratten eine CYP3A-Induktion bewiesen (Waxman 1999, Jones et al. 2000). Dies hängt vermutlich mit unterschiedlichen Substratbindungsstellen auf regulierenden Kernrezeptoren (siehe unten) zusammen (Stanley et al. 2006, Zucker et al. 2006). Bogaards et al. (2000) veröffentlichten eine Studie, in der 7 Spezies inkl. Mensch und Ratte bei der Untersuchung von 9 verschiedenen CYP-Aktivitäten verglichen wurden, um zur Ermittlung des am besten geeigneten Tiermodells bei In-vivo- und In-vitro-Experimenten beizutragen. Für die 6 β -Testosteronhydroxylierung (6 β -TH), die zum großen Teil durch CYP3A katalysiert wird, ähnelten sich Ratte und Mensch.

Derzeit sind beim Menschen folgende Mitglieder der CYP3A-Enzymfamilie bekannt: CYP3A4, 3A5, 3A7 und 3A43, wobei CYP3A4 die größte Rolle spielt. Der CYP3A-Genlocus, als Cluster vorliegend, befindet sich auf Chromosom 7 im Bereich 7q21.1 – 7q22.1 (Gellner et al. 2001). Bei der Ratte sind die bisher sechs bekannten Enzyme auf dem Rattenchromosom 12 (RNO12) in einem Cluster lokalisiert: CYP3A1 (Gonzalez et al. 1985), welches dem CYP3A4 des Menschen entspricht, CYP3A2 (Gonzalez et al. 1986), CYP3A9 (Wang et al. 1996), CYP3A18 (Nagata et al. 1996, Strotkamp et al. 1995), CYP3A62 (Matsubara et al. 2004) und CYP3A23 (Huss et al. 1996), wobei es sich beim letztgenannten Isoenzym um eine Variante von CYP3A1 handeln könnte (Nagata et al. 1999). Ein weiterer Unterschied der CYP3A-Enzyme von Ratte und Mensch besteht in der geschlechts- und altersabhängigen Expression bei der Ratte (Mahnke et al. 1997), wogegen dies beim Menschen wegen großer interindividueller Differenzen nicht zum Tragen kommt. Bei männlichen Ratten herrschen die Enzyme CYP3A1, CYP3A2 und CYP3A18 vor (Strotkamp et al. 1995). Weibchen hingegen exprimieren vornehmlich CYP3A9 (Mahnke et al. 1997). Männliche Ratten weisen von vornherein eine höhere CYP3A-Grundaktivität auf, insbesondere, wenn die TH als Parameter verwendet wird, da an dieser Reaktion CYP3A1 und CYP3A2 beteiligt sind. Deshalb wurden für die Versuche der vorliegenden Dissertation weibliche Tiere verwendet, deren entsprechende relativ geringe basale TH-Aktivität durch Induktoren um ein Vielfaches gesteigert werden kann. Die höhere Sensitivität beim Nachweis der CYP3A1-Induzierbarkeit mittels TH an weiblichen Ratten konnte bereits mit Rattenleberschnitten demonstriert werden; auf der mRNA-Ebene bestand dagegen kein nennenswerter Geschlechterunterschied (Glöckner et al. 2003).

Beeinflussung der CYP-Genexpression durch Kernrezeptoren

Frühe Studien an CYP3A der Rattenlebern zeigten, dass sowohl Glucocorticoide (z. B. Dex) als auch Antiglucocorticoide (z. B. PCN) diese Enzyme auf dem transkriptionalen Level induzieren (Schuetz und Guzelian 1984). Dabei spielen zahlreiche nukleäre Faktoren, zu denen auch der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) und der Constitutive Androstane-Rezeptor (CAR) zählen, eine Schlüsselrolle. Kernrezeptoren zeichnen sich durch 3 Eigenschaften aus: 1.) Die Liganden binden an einer Domäne. 2.) Nachdem zwei Kernrezeptoren jeweils mit einem Liganden besetzt sind, dimerisieren sie und lösen somit ein Signal aus. 3.) Das Dimer ist befähigt, durch eine Kernpore in den Zellkern vorzudringen und dort an spezielle Erkennungsstellen

der DNA zu binden und die Expression der betroffenen Gene zu beeinflussen. Die CYP3A-Induktion wird vornehmlich durch PXR und CAR vermittelt (Lehmann et al. 1998, Moore et al. 2000). Bei PXR handelt es sich um einen von insgesamt fünf bekannten CYP-regulierenden nukleären Rezeptoren (NR) mit höchster Expression in der Leber. PXR gehört wie auch CAR zur Genfamilie NR1 (Waxman 1999). Sie interagieren mit anderen NR und stellen intrazelluläre Signalwege dar. Der Sachverhalt, dass endogene Liganden identifiziert wurden und sich daraus physiologische Funktionen ergaben, legt die Vermutung nahe, dass diese Rezeptoren primär der Modulation der hepatischen CYP-Funktion dienen, um auf Nahrungs- und Hormonstimuli reagieren zu können. PXR aktiviert CYP3A-Gene als Antwort auf unterschiedliche Substanzen, insbesondere auf natürliche und synthetische Steroide.

Bekannt ist, dass auch PB zu einer Induktion von CYP3A befähigt ist, jedoch in geringerem Umfang als Dex. Die Induktion vom PB-Typ (Parkinson 1996) erfolgt über den im Cytosol vorliegenden CAR. Nach Bindung eines Liganden wird er mit Hilfe von Proteinfaktoren in den Kern verlagert und kann anschließend nach erfolgter Heterodimerisation mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) die Transkription der Zielgene veranlassen. Es sind nicht alle Einzelheiten dieser sehr komplexen Vorgänge bekannt (Yamada et al. 2006). Neben der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme wie CYP2B führt PB auch zu einer Proliferation des endoplasmatischen Retikulums in Hepatozyten, einer Zunahme der Lebergröße und zur Tumorpromotion (Yamamoto et al. 2004).

Hier zeigt sich also, dass CYP3A durch Substanzen verschiedener Induktionstypen beeinflusst wird. Es ist zu erwarten, dass sich generell Interaktionen zwischen Vertretern verschiedener Induktorklassen wie Dex und PB ergeben können, verursacht sowohl durch gemeinsame direkte Einflüsse als auch indirekt durch die Veränderung von aktuellen Rahmenbedingungen. Aus der Literatur sind Hinweise vorhanden, dass ein ganzes Netzwerk von Faktoren für die komplexe Regulation der CYP3A-Expression verantwortlich ist (Aouabdi et al. 2006). Dex und PB haben beide einen Einfluss darauf (Gibson et al. 2002, Goodwin et al. 2002). Daher wurden diese beiden Modellsubstanzen gewählt, um Interaktionen zwischen CYP3A- und CYP2B-Induktoren bei der CYP3A-Induktion an Rattenleberschnitten zu untersuchen.

2.5. Modelle zur Untersuchung der CYP-Induktion

Enzyminduktionsversuche sind sowohl am lebenden Organismus als auch an In-vitro-Modellen mit intakten Zellen möglich, worunter Leberzellkulturen und Präzisionsleberschnitte zählen.

2.5.1. In-vivo-Modelle

Bei der Verwendung von In-vivo-Modellen zur Untersuchung der Induktionswirkung von Fremdstoffen erfolgt die einmalige oder wiederholte Applikation der zu untersuchenden Substanz am lebenden Tier. Nach Ablauf des Beobachtungszeitraums erfolgt die Entnahme der Leber. Es ist möglich, einerseits Gewebeproben direkt nach der Entnahme zu analysieren und andererseits Abschnitte desselben Organs für spätere Versuchsansätze zu präparieren und zu konservieren.

2.5.2. In-vitro-Modelle

Ziel von In-vitro-Modellen ist es, die Bedingungen des intakten Organismus möglichst genau nachzubilden, um Vorhersagen für In-vivo-Effekte treffen zu können. Bezüglich des Fremdstoffmetabolismus belegten Hewitt et al. (2007) in einer Übersichtsarbeit die prinzipielle Eignung von In-vitro-Assays zur Risikoabschätzung für In-vivo-Ereignissen. Die Entwicklung leistungsfähiger In-vitro-Modelle ermöglicht die Reduktion von Tierversuchen. Parallel- und Kontrollproben für die verschiedenen Versuche können einem Organ entnommen werden, was sowohl das Problem interindividueller Variabilität reduziert bzw. ausschaltet als auch aus ethischen und pekuniären Gründen vorteilhaft ist.

Zur Erforschung der Enzyminduktion eignen sich als In-vitro-Modelle mit intakten Zellen vor allem Hepatozytenkulturen und Leberschnitte, da diese einen funktionsfähigen Genexpressions- und Proteinsyntheseapparat besitzen (Bjornsson et al. 2003, Brandon et al. 2003, Ekins et al. 2000, Groneberg et al. 2002).

Hepatozytenkulturen

Da die Leber das Hauptorgan des Fremdstoffmetabolismus ist, haben sich vor allem Primärkulturen von Hepatozyten zur Untersuchung von Reaktionen der Biotransformation etabliert. Unter standardisierten Bedingungen können in kurzer Zeit eine Vielzahl von Xenobiotica untersucht werden, wobei nur geringe Mengen von Testsubstanzen erforderlich sind. Die notwendigen Isolations- und Kultivierungsverfahren

wirken sich jedoch negativ auf die Funktionsfähigkeit der Leberparenchymzellen aus. Die Genexpression einer aus dem Gewebeverband vereinzelter Zelle spiegelt nicht ausreichend die In-vivo-Verhältnisse wider (Boess et al. 2003). Nach Verlust der typischen Gewebearchitektur und Zerstörung der physiologischen Zell-Zell-Kontakte kommt es zu einer raschen Entdifferenzierung und zu einer Beeinträchtigung organspezifischer Eigenschaften. Dies hat zur Folge, dass bei einem Nachlassen oder gar Verlust enzymatischer Aktivitäten (Berry et al. 1991) Induktionsversuche nicht mehr durchgeführt werden können. Um die zellspezifischen Aktivitäten der Hepatozyten über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhalten, wird in der Kultivierungstechnik auf verschiedene Verfahren gesetzt. So wird den Nährmedien in einigen Fällen Dex zugesetzt (z. B. 10^{-8} M bei Saad et al. 1993, 1994). Hiermit soll die basale CYP3A-Expression aufrechterhalten werden (Silva et al. 1998). Zur Untersuchung der CYP-mRNA-Induzierbarkeit sind solche Kulturansätze nur noch bedingt geeignet.

Ein weiterer Nachteil ist die zwei- bis dreitägige Regenerationsphase frisch angelegter Hepatozytenkulturen, bevor die ebenso lange dauernden Versuche begonnen werden können (Bjornsson et al. 2003). Die personal- und zeitaufwendige Vorbereitung der Zellkulturen entfällt bei der Verwendung von Präzisionsleberschnitten, die nun näher erläutert werden sollen.

Präzisionsleberschnitte

Die Vorteile der Schnitte gegenüber isolierten Hepatozyten sind ein intakter Gewebeverband mit verschiedenen Zellarten (z. B. Kupfferzellen, Fibroblasten, Endothelien, Gallengangsepithelien) und deren Wechselwirkungen untereinander bei erhaltenen physiologischen Zell-Zell-Kontakten und damit verbundener langsamerer Entdifferenzierung der Hepatozyten, der Verzicht auf potentiell schädigende Zellisierungsprozesse und die schnelle Verfügbarkeit. In-vivo-Verhältnisse werden gut widerspiegelt.

Die Nachteile von Präzisionsleberschnitten sind das Entstehen von Koagulationsnekrosen in zentralen Zellschichten (Lupp et al. 2001, Neupert et al 2003), bedingt durch die mangelnde Substrat- und Sauerstoffzufuhr, und die Schädigung von Zellen beim Schnittvorgang.

1923 wurde von Otto Warburg erstmals der Gebrauch von Leberschnitten für In-vitro-Untersuchungen beschrieben, wobei einfachste Schnittgeräte zur manuellen Bedienung Verwendung fanden. Die Sauerstoffunterversorgung der im Zentrum der relativ dicken Schnitte gelegenen Zellen führte zu Gewebedestruktion, was die Unter-

suchungsergebnisse deutlich beeinträchtigte. Nach der Entwicklung eines präzise, nahezu atraumatisch und in physiologischer Pufferlösung (Ekins 1996) arbeitenden Gewebeschneiders durch Krumdieck et al. (1980) und Optimierung von Kulturmedien und Inkubationssystemen hat sich die Überlebensfähigkeit der Zellen deutlich verbessert und die Einsatzmöglichkeiten sind heute vielfältig. Es sind Inkubationszeiten von bis zu 72 Stunden möglich (Lake et al. 1993, Lerche-Langrand und Toutain 2000). Für die vorliegende Dissertation kam Williams' Medium E (WME) zum Einsatz, in dem die Präzisionsleberschnitte unter kontinuierlicher Carbogenbegasung im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert wurden.

Die optimale Schnittdicke wird mit 0,25 mm angegeben (Drobner et al. 2000, Gebhardt et al. 2003), da einerseits bei dickeren Schnitten aufgrund der zentralen Nähr- und Sauerstoffunterversorgung ischämische Nekrosen auftraten und sich andererseits bei dünneren Schnitten die Relation von intakten zu schnittgeschädigten Zellen an der Oberfläche ungünstig auf die Versuche auswirkten (Dogterom 1993).

Prinzipiell ist die Verwendung von humanem Spendergewebe wünschenswert, jedoch lassen sich grundlegende Fragen trotz aller Speziesunterschiede auch an Leberschnitten von Versuchstieren klären. Gerade bei menschlichem Gewebe ist mit beträchtlichen interindividuellen Unterschieden zu rechnen, zum einen begründet durch die genetischen Gegebenheiten beim Gewebespender, andererseits durch veränderte CYP-Expression durch Krankheiten oder äußere Einflüsse wie Ernährung, Medikamenteneinnahme und Nikotinabusus. Auch der Einfluss notwendiger Pharmaka unmittelbar vor oder während der Gewebeentnahme, zum Beispiel im Rahmen einer Narkose, könnte Auswirkungen haben. Problematisch stellt sich außerdem die eingeschränkte Verfügbarkeit von Humangewebe dar.

Um langfristig die Anzahl der Tierversuche reduzieren zu können, ist es notwendig zu klären, unter welchen Bedingungen menschliches Lebergewebe für welche Untersuchungsziele geeignet ist und welche Einschränkungen zu beachten sind. Dazu soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten. Bis ausreichende Erkenntnisse über die Verwertbarkeit von humanem Gewebe vorliegen, wird auf Präzisionsleberschnitte von Versuchstieren, häufig von Ratten, zurückgegriffen, die sich als ökonomisches und leistungsfähiges In-vitro-Modell bewährt haben, da sie In-vivo-Verhältnisse gut widerspiegeln und für Akutversuche von bis zu 72 Stunden schon vielfältig Anwendung fanden (Lerche-Langrand und Toutain 2000, de Graaf et al. 2007).

2.6. CYP3A-Induktion in Präzisionsleberschnitten

Zahlreiche Studien befassen sich mit der CYP3A-Induktion in Präzisionsleberschnitten als In-vitro-Modell. An Ratten- und Mäuseleberschnitten konnte Gokhale et al. (1997) auf Enzymaktivitätsebene nachweisen, dass durch PB eine CYP3A-Induktion erzielt werden kann. Dem Inkubationsmedium war hierbei stets 1 μM Dex zugesetzt, um die Funktionsfähigkeit der Schnitte zu verbessern. Lupp et al. (2001) nutzten immunhistochemische Nachweisverfahren, um zu belegen, dass Dex (1 μM) und PB (100 μM) zu einer In-vitro-Induktion von CYP3A in Rattenleberschnitten führen. Dies wurde auch an kryokonservierten Rattenleberschnitten nachgewiesen (Lupp et al. 2002). Durch Glöckner et al. (2002) konnte auf der mRNA-Ebene die signifikante CYP3A1-Expressionssteigerung durch PCN gezeigt werden. Hierbei lagen die Induktionsfaktoren frischer und kryokonservierter Schnitte in gleichen Größenordnungen. Auch zahlreiche andere Arbeiten befassten sich mit dem Nachweis der CYP3A-Induktion in Leberschnitten männlicher Ratten durch Dex und/oder PCN auf der mRNA-Ebene (Meredith et al. 2003, Martignoni et al. 2004, Cui et al. 2005, Khan et al. 2009) oder auf der Enzymaktivitätsebene (Martignoni et al. 2004). Auf den Vergleich von Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten hinsichtlich der basalen und induzierten CYP3A1-Expression (Glöckner et al. 2003) war bereits vorn eingegangen worden (siehe Abschnitt 2.4.). Bei diesem Vergleich wurde die als optimal ermittelte Konzentration von 1 μM Dex verwendet. Jedoch ist aus Arbeiten mit isolierten Hepatozyten bekannt, dass die Induktorwirkung von Dex konzentrationsabhängig ist und dual sein kann, indem höhere Konzentrationen schwächer als niedrigere wirken (Sidhu und Omiecinski 1995, Pascussi et al. 2001, Ringel et al. 2002). Demirdag (2010) bestätigte an Leberschnitten weiblicher Ratten die Konzentrationsabhängigkeit der Dex-Wirkung, ohne einen dualen Effekt zu finden. Da Versuchsergebnisse auch von konkreten Bedingungen abhängen, wurde in der vorliegenden Arbeit diese Konzentrationsabhängigkeit zeitnah nochmals durchgeführt. Lupp et al. (2008) zeigten, dass Leberschnitte ca. 40 Tage alter männlicher Ratten besser geeignet sind, eine CYP3A-Induktion durch Dex nachzuweisen als solche von neugeborenen und einjährigen Tieren, was auch für andere CYP und Induktoren zutraf. Daher wurden auch für die vorliegende Arbeit 40 Tage alte Ratten verwendet. In zunehmendem Maße wurden Biotransformationsversuche an menschlichem Gewebe am In-vitro-Modell des Präzisionsleberschnittes durchgeführt (Lake et al. 1997, Glöckner et al. 1999, Persson et al. 2006, Khan et al.

2009), die z. T. auch CYP3A betrafen. Mögliche Quellen für die Gewebegewinnung stellen klinisch nicht verwendbare Spenderorgane oder Resektionsmaterial aus chirurgischen Eingriffen (z. B. partielle Hepatektomie bei Lebermetastasen) dar. Die Verfügbarkeit humanen Gewebes ist stark eingeschränkt und die Versuche sind schwer planbar. Hinzu kommen die großen interindividuellen Differenzen in Gewebeeigenschaften und -qualität, auf die bereits vorn (Abschnitt 2.5.2.) eingegangen wurde. Bei Olinga et al. (1998a, 1998b) finden sich Hinweise auf den Einfluss der Dauer der Gewebezwisehenlagerung und -präparation und auch zur Auswirkung von hepatischen Grunderkrankungen auf die Vitalität und Funktion der daraus hergestellten Schnitte. Fisher et al. (2001) konnten belegen, dass entscheidend für den Versuchsausgang die Qualität des Humanlebergewebes bei der Entnahme ist. Hierfür wurden gesunde Transplantatlebern den Gewebeproben von Tumorpatienten gegenübergestellt. Es erscheint daher sinnvoll, Humanlebergewebe umfassend zu charakterisieren, bevor es zur Präparation von Leberschnitten eingesetzt wird. Möglicherweise kann dadurch die Eignung des Gewebes für bestimmte Untersuchungsziele vorbestimmt werden.

Eine besondere Bedeutung ist dem Expressionsstatus des zur Verfügung stehenden Gewebes beizumessen. Es ist bekannt, dass eine Induzierbarkeit um so stärker ausfällt, je niedriger die vorher bestehende Basalaktivität ist (Bjornsson et al. 2003). Dies wurde auch für die 6 β -TH als Maß für eine CYP3A-Induktion festgestellt (Lindley et al. 2002, McCune et al. 2000). Daher wäre es möglich, dass bei schon vorbestehender starker Expression kein erkennbarer Aktivitätszuwachs mehr durch Induktion erreichbar ist. Dieser Problematik wurde in früheren Versuchen mit Leberschnitten bereits nachgegangen.

Zunächst wurde geprüft, ob sich eine CYP-Vorinduktion in vivo auf die Induzierbarkeit mit dem gleichen Induktor in vitro an Rattenleberschnitten nachteilig auswirkt. Eine CYP1A1-Induktion durch den Modellinduktor Beta-Naphthoflavon (BNF) war unabhängig von der initial vorliegenden CYP1A1-Expression des Spendergewebes sowohl auf der Aktivitäts- als auch auf der mRNA-Ebene sicher in vitro nachweisbar, da ein vorbestehender In-vivo-Induktionseffekt anschließend in den Leberschnitten sehr schnell abklang (Glöckner et al. 2001). Eine Vorbehandlung weiblicher Ratten mit Dex äußert sich ex vivo in den Leberschnitten dieser Tiere ebenfalls in einer Erhöhung der entsprechenden CYP3A-abhängigen Enzymaktivitäten (6 β -, 2 β -, 15 β -TH). Eine erneute Induktion durch den gleichen Induktor in vitro war von Anfang an

trotz des noch hohen Expressionsstatus möglich, allerdings auf Aktivitätsebene für die 6 β -TH weniger deutlich als für die 2 β - und 15 β -TH. Auch auf der mRNA-Ebene war nach vorausgegangener In-vivo-Induktion bereits nach 24 Stunden eine erneute Induktion in vitro nachweisbar, bedingt durch ein rasches Abklingen der in vivo induzierten CYP3A1-Expression in den Präzisionsleberschnitten (Lieder 2007). Hingegen war beim PB-Induktionstyp kaum noch eine Induktion der CYP2B1-abhängigen PROD in vitro auszulösen, wenn die Tiere mit PB vorbehandelt wurden, da die Wirkung auch in vitro nur sehr langsam abklang (Lerch 2008).

Anschließende Versuche sollten klären, ob sich die In-vivo-Vorbehandlung mit bestimmten Induktoren auf die In-vitro-Induzierbarkeit anderer Induktionstypen auswirkt. Dazu konnte bisher gezeigt werden, dass sowohl eine CYP1A1- als auch eine CYP2B1-Induktion an Rattenleberschnitten ungehindert stattfindet, auch wenn bei den Tieren in vivo eine CYP3A1-Induktion mit Dex stattgefunden hatte (Reinhardt 2009, Rohländer 2011). Ähnlich verhielt es sich mit einer CYP3A1-Induktion in vitro, die durch eine vorangegangene CYP1A1-Induktion in vivo nicht behindert wurde (Demirdag 2010).

In der vorliegenden Dissertation sollte die CYP3A-Induzierbarkeit in vitro durch den Modellinduktor Dex nach Einwirkung des Modellinduktors PB untersucht werden. Dex ist sowohl als Arzneimittel von Bedeutung, hat aber auch sehr komplexe Wirkungen auf das CYP-System insgesamt (siehe Abschnitt 2.4.) und wird zudem häufig in In-vitro-Systemen wie Zellkulturen eingesetzt, um eine Entdifferenzierung zu verhindern.

Zum Nachweis der Biotransformationsaktivität wurde die Methode der TH genutzt mit Beschränkung auf den Nachweis der 2 β - und 15 β -TH, da mit diesen beiden TH-Metaboliten die Charakterisierung der CYP3A-Aktivität und -Induzierbarkeit am besten möglich ist (Glöckner et al. 2008). Neben der Enzymaktivität wurde auch stichprobenartig zunächst mittels Reverser Transkription-Polymerase-Kettenreaktion RT-PCR der CYP3A1-mRNA-Gehalt in den Leberschnittproben ausgewählter Tiere semiquantitativ bestimmt. Anschließend wurde eine kompetitive RT-PCR zur Quantifizierung der spezifischen mRNA-Expression vorgenommen. Zum Aktivitätsnachweis des durch PB induzierten Enzyms CYP2B1 diente die PROD als Modellreaktion (Parkinson 1996).

3. Zielstellung

Das hauptsächliche Anliegen dieser Arbeit bestand darin zu klären, ob eine In-vitro-Induktion des Enzyms CYP3A1 durch Dex auch dann nachweisbar ist, wenn die CYP2B-Expression zuvor oder gleichzeitig mit dem Modellinduktor PB verändert wurde. Als In-vitro-Modell wurden Rattenleberschnitte weiblicher Tiere mit einem Alter von 40 Tagen verwendet. Anhand der Ermittlung der Enzymaktivitäten und der Bestimmung der CYP3A1-mRNA erfolgte die Beurteilung der CYP3A1-Induktion. Damit sollte zur Klärung der Frage ein Beitrag geleistet werden, ob sich der in vivo unterschiedlich ausgeprägte CYP-Expressionszustand von Spendergewebe durch Interaktionen verschiedener Induktoren (hier Dex und PB) auf Testergebnisse in vitro auswirkt. Es sollten folgende Fragen geklärt werden:

- **Wird eine In-vitro-Induktion der CYP3A1 mit Dex durch eine In-vivo-CYP2B-Induktion mit PB beeinflusst?**

Da die Nutzung menschlichen Gewebes zur Erforschung von Arzneimittelwirkungen und -nebenwirkungen anzustreben ist, galt es zu klären, inwieweit sich Spendergewebeeigenschaften, hervorgerufen durch den therapeutischen oder intraoperativen Einsatz von Medikamenten, auf die Ergebnisse von Induktionsversuchen auswirken. In der durchgeführten Versuchsreihe wurde im Tierversuch durch intraperitoneale Injektion von PB eine CYP2B-Induktion hervorgerufen. Die Präzisionsleberschnitte wurden anschließend über einen Zeitraum von 24 Stunden unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des Induktors Dex inkubiert. Abschließend wurde das Ausmaß der CYP3A1-Induktion ermittelt. Somit sollten Aussagen über die Verwendbarkeit von PB-vorinduziertem Lebergewebe für CYP3A1-Induktionsversuche getroffen werden können.

- **Wird eine CYP3A1-Induktion in vitro auch bei gleichzeitiger Einwirkung des CYP2B-induzierenden PB nachweisbar sein?**

In diesem Versuchsabschnitt erfolgte die gleichzeitige Inkubation von Rattenleberschnitten unbehandelter Weibchen mit verschiedenen Modellinduktortypen, vertreten

durch Dex und PB, für 24 Stunden. Diese Versuchsanordnung wurde gewählt, um zu klären, ob durch die Interaktion des simultan eingesetzten CYP2B-Induktors PB der Dex-Effekt vermindert oder maskiert werden kann. Hierbei fanden eine mit 5 μM niedrige und eine mit 100 μM hohe PB-Konzentration Verwendung, um differenzieren zu können, ob es Unterschiede zwischen schwachen und potenten CYP2B-Induktoren gibt.

- **Stört eine CYP2B-Induktion durch Einwirkung von PB in vitro eine nachfolgende CYP3A1-Induktion, die durch eine anschließende Dex-Exposition in vitro ausgelöst wird?**

Dieser Versuchsabschnitt sollte klären, ob eine 24-stündige In-vitro-Vorinduktion durch PB in den Konzentrationen von 5 und 100 μM vor der sich anschließenden Inkubation mit Dex für weitere 24 Stunden die Versuchsergebnisse bei gleichzeitiger Einwirkung der Modellreaktoren widerspiegeln. Die Untersuchungsergebnisse könnten bei entsprechender Übereinstimmung mit den Befunden aus den Simultanversuchen zu einer Reduktion der Tierversuche beitragen. Letztendlich besteht die Bestrebung in einer dauernden Nutzung menschlichen Gewebes, jedoch ist nicht sicher, ob sich das Material zur Etablierung von Standardnachweismethoden eignet.

Diese Dissertation sollte weiterhin zur Etablierung von Präzisionsleberschnitten beitragen, welche sich bereits als ökonomisches und leistungsfähiges In-vitro-Modell bewährt haben. Das Ziel der Arbeit bestand nicht in der Erforschung der vielschichtigen Mechanismen der Enzyminduktion und der Induktor-Interaktionen.

4. Material und Methoden

4.1. Versuchstiere

4.1.1. Haltung der Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an Lebern von ca. 40 Tage alten weiblichen Wistarratten (Han:WIST) aus der Zucht des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter Standardbedingungen bei einem 12/12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus, einer Raumtemperatur von 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchte von $\geq 50 \pm 10$ %. Der auf max. 6 Jungtiere begrenzte Wurf verblieb bis zum 30. Lebenstag bei der Mutter. Die Aufzucht erfolgte mit Standardfutter (Altromin® 1316-Pellets) und Leitungswasser ad libitum. Die für reine In-vitro-Versuche bestimmten Tiere (insgesamt 5 Versuchsserien) erfuhren keine Vorbehandlung.

4.1.2. Vorbehandlung der Versuchstiere

Die Tiere einer Versuchsserie wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen durch intraperitoneale Injektion von jeweils 60 mg PB/kg Körpermasse, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, vorbehandelt. 24 Stunden nach der letzten Injektion erfolgte die Tötung, um die Lebern zu gewinnen.

Die Durchführung einer Kontrollserie mit Injektion reiner Kochsalzlösung erübrigte sich, da sich in früheren Untersuchungen kein Einfluss auf das Induktionsverhalten zeigte (Giese und Giese 1990).

4.2. Schnittpräparation

Die Tiere wurden in Ethernarkose dekapitiert und ausgeblutet. Nach Eröffnung des Abdomens von ventral erfolgte die Entnahme der Leber unter Vermeidung einer Kontamination mit Magen- und Darminhalt. Nach zweimaliger Spülung des Organs mit Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer (KH-Puffer), pH 7,4 (Zusammensetzung siehe unten) und Separation der einzelnen Leberlappen wurden Gewebezyylinder mit einem Durchmesser von 8 mm gestanzt. Mit Hilfe des KH-Puffer gefüllten Krumdieck-Schneiders (Alabama R&D Corp., Munford, AL, USA) ließen sich Präzisionsleberschnitte mit einer Dicke von 200-250 µm anfertigen. Die Schnitte wurden portionsweise in die vorbereiteten Inkubationsgefäße überführt. Von jeder Leber wurden zusätzlich Gewebestücke entnommen, sofort in flüssigem Stickstoff

eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert, um die Ausgangslage des Gewebes vor der Schnittpräparation zu erfassen.

- Zusammensetzung des KH-Puffers

• $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	1,25 mM
• KCl	4,80 mM
• KH_2PO_4	1,20 mM
• $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,20 mM
• NaCl	120,00 mM
• NaHCO_3	25,00 mM

- Der Gebrauchslösung wurden am Versuchstag zugesetzt:

• HEPES-Puffer	3 g/l Pufferlösung (12,6 mM)
• Gentamicinsulfat	50 mg/l Pufferlösung
• Ampicillin-Natrium	10 mg/l Pufferlösung

- Die Begasung der Gebrauchslösung erfolgte mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) für 30 Minuten.

4.3. Inkubation der Leberschnitte

Zur Inkubation fanden Erlenmeyer-Kölbchen mit einem Fassungsvermögen von 25 ml Verwendung, die mit 5 ml WME (Biochrom AG seromed®) gefüllt und mit jeweils 4 Schnitten bestückt wurden. Zusätze, mit denen das Medium immer versetzt wurde, sind im Folgenden angegeben.

- Zusätze zum Inkubationsmedium [Menge/100 ml WME]

• Ampicillin-Natrium	1,0 mg
• Gentamicinsulfat	5,0 mg
• Insulin (Actrapid® HM 40 I.E./ml)	345,0 µl
• L-Glutamin	29,2 mg
• Tylosin	10,0 mg

Außerdem wurden dem Medium je nach Versuchsgruppe (siehe Abbildung 4.1.) die Induktoren Dex (Fortecortin® Inject 4 mg, Merck) mit einer Endkonzentration von 0,1-1,0 µM und/oder PB (als Natriumsalz) mit einer Endkonzentration von 5 oder 100 µM zugesetzt, wobei stets verschiedene Vergleichsgruppen ohne Induktoren mitgeführt wurden. Während der gesamten Inkubation wurden die Kölbchen unter Carbogenbegasung (95% O₂, 5% CO₂) bidirektional (ca. 95 rpm) im Schüttelwasserbad (SW 21-C, Julabo) bei 37 °C bewegt.

Nach 2 und ggf. 24 Stunden Schnittinkubation wurde ein Medienwechsel vollzogen, indem die Schnitte in neue Kölbchen überführt wurden. Die Inkubationsdauer betrug je nach Versuchsserie insgesamt 24 oder 48 Stunden. Danach wurden die Schnitte portionsweise (jeweils Pool aus 3-5 Schnitten) mit Filterpapier abgetupft und auf einer Analysenwaage (Sartorius MC1 Analytik AC 210 P) gewogen und verschiedene Parameter zur Einschätzung der CYP3A1-Induktion in vitro bestimmt (siehe Abschnitt 4.6. und 4.7.). Anschließend wurden die Proben bei –80 °C eingefroren, um später die Bestimmung des Proteingehalts, der Biotransformationsaktivitäten und der CYP3A1-mRNA-Expression vorzunehmen.

4.4. Versuchsdesign

Es wurden insgesamt vier unabhängige Versuchsserien durchgeführt, deren Aufbau in Abbildung 4.1. schematisch dargestellt ist. Bei allen Versuchen wurden die Leberschnitte für 24 Stunden mit Dex inkubiert, gefolgt von der Probenentnahme und späteren Bestimmung der CYP3A1-Induktion.

Weiterhin erfolgte eine in der Abbildung nicht ersichtliche Parameterbestimmung im Lebergewebe vor der Schnittpräparation bei allen Versuchsserien und bei den Versuchen mit sukzessiver Induktorexposition in vitro zusätzlich nach einem zweiten Wechsel des Mediums vor der Zugabe von Dex.

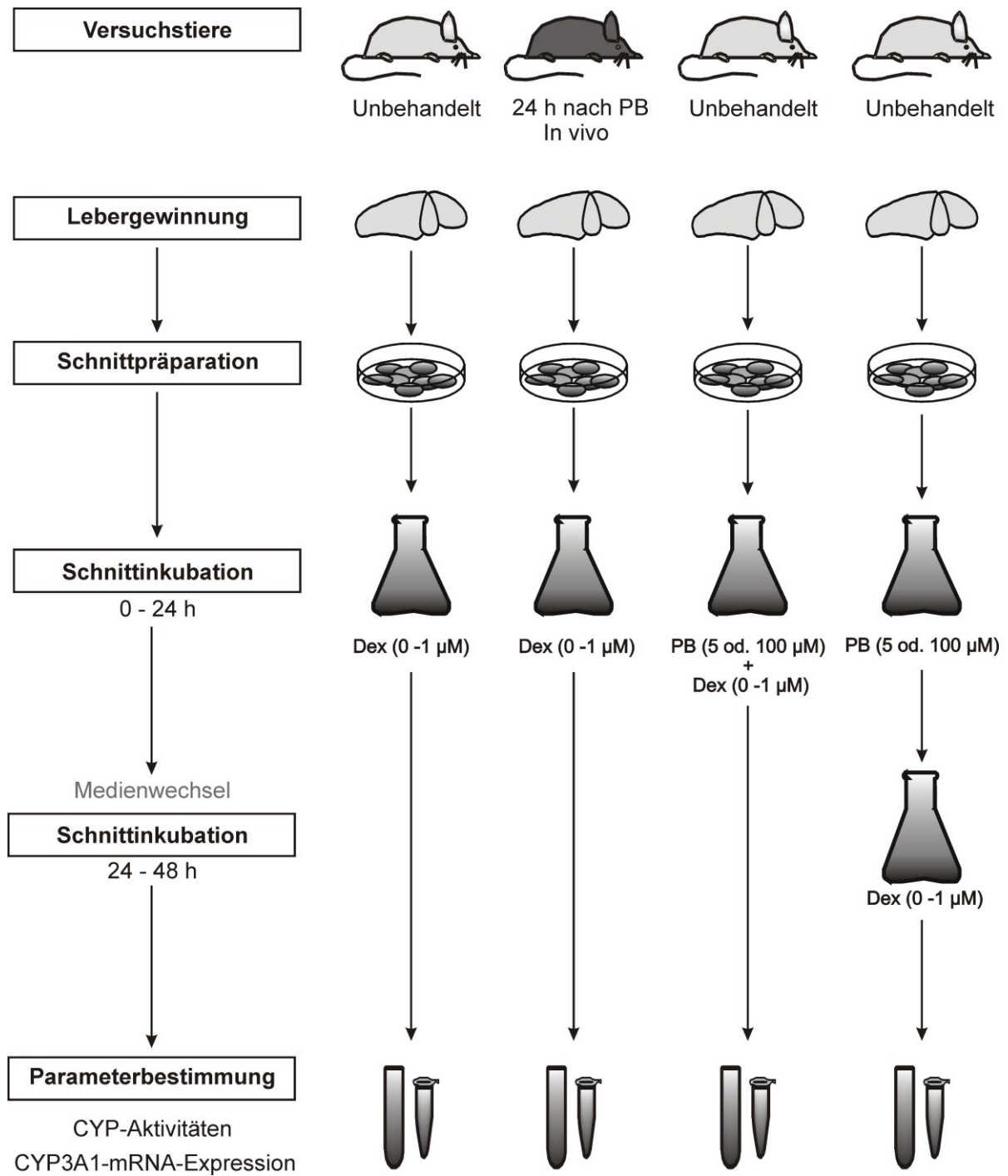


Abbildung 4.1.: Versuchsdesign. Dargestellt ist die Verwendung unbehandelter und mit PB vorbehandelter (3 x 60 mg/kg KM i.p.) Tiere und die anschließende Schnittinkubation mit Dex allein oder mit Dex und PB simultan bzw. sukzessiv.

4.5. Bestimmung der Biotransformationsaktivität

Sämtliche Bestimmungen wurden mit Leberschnitthomogenat durchgeführt. Zur Herstellung wurden die aus einem Pool von 5 Leberschnitten bestehenden Proben mit 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,4) versetzt und mittels Ultraschall unter Eiskühlung homogenisiert. Die Verdünnung der Proben betrug 1:30 (1 Teil Leber, 29 Teile Puffer). Die Ergebnisse der Biotransformationsreaktionen wurden stets auf den Proteingehalt der Proben bezogen und in $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ angegeben.

4.5.1. Bestimmung des Proteingehalts als Bezugsgröße

Mit Hilfe der Biuret-Methode, modifiziert nach Klinger und Müller (1974), wurde der Proteingehalt des Leberschnitthomogenats bestimmt. Hierbei gehen Proteine im alkalischen Milieu mit Kupfersulfat Komplexverbindungen ein. Die Intensität der daraus resultierenden blauvioletten Färbung korreliert direkt mit der Anzahl der Peptidbindungen. Für jede Probe wurde ein Mess- und ein Trübungsansatz mit entsprechenden Leerwerten untersucht, um einen bei der Bestimmung auftretenden Trübungsfehler auszuschalten.

Durch Zugabe von Na-Desoxycholat zum Homogenat wird die Eiweißstruktur gelockert. Anstelle des Homogenates enthielten die entsprechenden Leerwerte aqua bidest. Anschließend wurde zu den Proben und den dazugehörigen Probenleerwerten Biuret-Reaktionslösung und zu den Trübungsansätzen 3%ige NaOH-Lösung beigelegt. Nachfolgend wurden die Ansätze gemischt und nach einer Reaktionszeit von 30 min die Doppelbestimmungen gegen die betreffenden Leerwerte photometrisch gemessen. Die Eichung der Proteinbestimmung erfolgte mit Rinderserumalbumin. Die Ermittlung der Extinktion erfolgte am Spekol (Carl-Zeiss-Jena) bei einer Wellenlänge von 546 nm und einer Küvetten-Schichtdicke von 1 cm. Aus der Differenz der Extinktion von Mess- und Trübungsansatz ergibt sich der Proteingehalt.

4.5.2. Testosteronhydroxylierung (TH)

Durchführung der Inkubation mit Testosteron

Das 1:30 verdünnte Schnitthomogenat wurde dem Ansatz von Natrium-Phosphat-Puffer mit Magnesiumchlorid, Glucose-6-Phosphat (G-6-P) und dem in Methanol gelösten Substrat Testosteron zugesetzt. Die Reaktion wurde mit NADPH gestartet und nach 20-minütiger Inkubation bei 37 °C im Schüttelwasserbad mit Trichlor-essigsäure (0,31 M) gestoppt. An jedem Versuchstag wurde ein Leerwert mitgeführt, der anstelle des Homogenats Natrium-Phosphat-Puffer enthielt und nicht inkubiert wurde. Nach Zugabe von Corticosteron als Internen Standard (IS) zur Kalibrierung der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) wurden die Proben bis zur Weiteraufarbeitung bei – 80 °C gelagert.

Reaktionsansatz der TH:

- 200 µl 1:30-verdünntes Homogenat
- 10 µl Testosteron (0,5 mM)
- 200 µl Natrium-Phosphat-Puffer (0,1 M)
- 200 µl Magnesiumchlorid (100 mM)
- 200 µl G-6-P (25 mM)
- 200 µl NADPH (2,5 mM)

Bestimmung der TH-Metabolite mittels HPLC

Die Weiteraufarbeitung der Proben bestand aus einer Vorreinigung (Festphasenextraktion) mit anschließender Messung mittels HPLC. Die Festphasenextraktion erfolgte mittels StrataX-Säulen (Phenomenex) nach Herstellervorschrift. Die Säulen wurden zunächst im Extraktionsständer unter Vakuum mit 2 ml Methanol und anschließend mit 2 ml aqua bidest gespült. Der Durchfluss der anschließend mit zweimal 2 ml Probenflüssigkeit beladenen Säulen war auf eine maximale Durchlaufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min begrenzt. Die wasserlöslichen Substanzen wurden mit aqua bidest aus den Säulen extrahiert und verworfen. Das durch zweimalige Spülung mit 2 ml Methanol gewonnene Eluat wurde in Probenröhrchen aufgefangen. In einem auf 50 °C vorgewärmten Verdampfer wurde das Eluat unter Stickstoff-begasung bis zur vollständigen Trocknung eingengt. Die Lagerung bis zur Messung erfolgte bei Raumtemperatur.

Nach dem Lösen der eingeeengten Proben in 150 µl mobiler Phase (65,7 % Wasser, 27,3 % Methanol, 7 % Tetrahydrofuran) wurde die HPLC-Anlage beschickt. Aus den ermittelten Flächenintegralen von IS und Metaboliten und den mitgeführten Eichkurven mit 6 verschiedenen Konzentrationen für jeden Metaboliten konnte deren Konzentration ermittelt werden, um daraus die Umsatzraten zu berechnen. Für diese Arbeit waren die durch CYP3A1 gebildeten Metabolite 2β- und 15β-OH-T relevant, auf die die manuelle Auswertung der Flächenintegrale beschränkt wurde.

4.5.3. 7-Pentoxyresorufin-O-Depentylierung (PROD)

Die von Pohl and Fouts (1980) entwickelte PROD dient dem Aktivitätsnachweis des durch PB induzierten Enzyms CYP2B1. Es wurde das von Müller (1990) modifizierte Vorgehen angewendet, wobei Leberschnitthomogenat an Stelle von 9000g-Überstand eingesetzt wurde.

Durch die Zugabe des Substrats 7-Pentoxyresorufin zum Homogenat erfolgt eine CYP-abhängige Depentylierung. Das bei Abspaltung gebildete fluoreszierende Resorufin kann schon in minimaler Konzentration fluorimetrisch bestimmt werden. Die Zugabe der erforderlichen Kofaktoren im Überschuss entsprechend dem unten angegebenen Reaktionsansatz sorgt für optimale Reaktionsbedingungen. Das in Methanol gelöste Substrat wurde zunächst vorgelegt und das Lösungsmittel verdampft, bevor der Ansatz pipettiert wurde. Die Substratkonzentration betrug dann 10 µM.

Reaktionsansatz der PROD

- 100 µl 1:30-verdünntes Homogenat
- 100 µl Natrium-Phosphat-Puffer (0,1 M)
- 100 µl Magnesiumchlorid (100 mM)
- 100 µl G-6-P (25 mM)
- 100 µl NADPH (2,5 mM)

Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Das 1:30 verdünnte Schnitthomogenat wurde dem Ansatz von Natrium-Phosphat-Puffer 7-Pentoxyresorufin, Magnesiumchlorid und G-6-P zugesetzt. Nach 2 Minuten Vorinkubation der Proben im Schüttelwasserbad bei 37 °C begann durch Zugabe von 200 µl NADPH die Reaktion. Nach 10 Minuten wurde diese mit Methanol gestoppt. Im Gegensatz zu

den Probenhauptwerten wurden die mitgeführten Leerwerte zuerst gestoppt und erst nachfolgend mit NADPH versetzt.

Nach Zentrifugation der Proben erfolgte die Messung bei einer Exzitationswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 585 nm am Fluoreszenz-Spektralphotometer (F-2000, HITACHI). Für jede Messreihe wurde eine Eichkurve mit definierten Resorufinkonzentrationen angefertigt, um die Umsatzraten errechnen zu können.

4.6. Bestimmung der CYP3A1-mRNA-Expression

Aus jeder Versuchsserie wurden stichprobenartig die Proben von 2 Tieren für die Bestimmung der mRNA eingesetzt. Zunächst wurde von allen Versuchsgruppen eine Übersichts-PCR zur semiquantitativen Einschätzung der CYP3A1-mRNA-Expression durchgeführt, um anschließend mittels kompetitiver RT-PCR eine Quantifizierung in ausgewählten Gruppen (siehe Kapitel 5. Ergebnisse) vorzunehmen.

4.6.1. RNA-Isolation aus Lebergewebe

Jede Probe bestand aus einem Pool von 2 Schnitten. Es galt, die vorwiegend im Zytoplasma vorliegende guide RNA zu isolieren. Dazu wurde der InViSorb™ RNA Kit II entsprechend der Gebrauchsanweisung von InViTek eingesetzt. Zu Beginn erfolgte der mechanische Aufschluss des Lebergewebes mittels Handhomogenisierung in einem hypotonen Lysispuffer. Dieser Puffer zerstörte Zell- und Proteinstrukturen und inaktivierte endo- und exogene RNAsen, die ansonsten zu einer Zerstörung der Ribonukleinsäuren (RNA) führen würden. Weiterhin wurde stets mit RNase-freiem Wasser (NFW) gearbeitet, um eine exogene Kontamination zu minimieren. Die zytosolische Gewebefraktion wurde im Anschluss mit Adsorbin, einem mineralischen Trägermaterial, behandelt. Hierdurch wurde die genomischen Desoxyribonukleinsäuren (DNA) fixiert, die sonst im weiterführenden Versuchsablauf die Ergebnisse verfälscht hätte.

Im nächsten Versuchsabschnitt erfolgte die Isolierung der gRNA durch Phenol-extraktion. Die ausgeschüttelten und zentrifugierten Proben trennten sich auf in eine RNA-haltige Oberphase zur Weiterverwendung, in eine zu verwerfende Interphase (proteinhaltig) und die phenolische Unterphase (DNA- und proteinhaltig). Die Präzipitation der gRNA aus der entnommenen wässrigen Oberphase erfolgte mittels

Zugabe von Isopropanol. Nach der Abzentrifugation des gRNA-Pellets wurde dieses wiederholt mit 70%-igem Ethanol gewaschen.

4.6.2. Bestimmung der RNA-Konzentration (OD) und –reinheit

Zur Quantifizierung der RNA-Konzentration nutzt man das für Nukleinsäuren charakteristische Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm aus. Die Berechnungen basierten auf der Annahme, dass bei einem Lichtweg von 1 cm (Schichtdicke) und einer Konzentration von 40 µg/ml einzelsträngiger RNA der Extinktionswert OD 1 beträgt. Die zu ermittelnde Konzentration der RNA in den Proben ergab sich aus:

$$\text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktion} \times 40 / \text{Messvolumen} = \mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$$

In der vorliegenden Arbeit betrug der Verdünnungsfaktor 10 und die Schichtdicke, die das Messvolumen bestimmt, 0,3 cm. Der Extinktionswert wurde aus 4 Messergebnissen gemittelt.

Die Proteine besitzen aufgrund der aromatischen Seitenketten der Aminosäuren ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Durch Bildung des Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm können Rückschlüsse auf die Reinheit der Proben gezogen werden. Bei einer sauberen RNA-Präparation sollte der Quotient etwa bei 2 liegen. Stark mit Proteinen verunreinigte Proben weisen einen kleineren Quotienten unter 1,6 auf und sind für die weiterführende Verarbeitung in der Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ungeeignet.

4.6.3. Die RT-PCR

Das Ziel der RT-PCR war der Nachweis der Genexpression von CYP3A1 im Lebergewebe. Als spezifische Primer wurden Oligonucleotide folgender Sequenzen verwendet:

- **5'-GAT GTT GAA ATC AAT GGT GTG T-3'** als forward-Primer und
- **5'-TTC AGA GGT ATC TGT GTT TCC-3'** als reward-Primer.

Diese lösen die Bildung eines 290 bp großen RT-PCR-Produkts aus.

4.6.3.1. Die RT

Da RNA nicht amplifiziert werden kann, muss sie zunächst mit einer viralen reversen Transkriptase (RT) in cDNA translatiert werden. Die RT wurde mit Reagentien der Firma Promega durchgeführt.

- Standardansatz für die RT einer Probe
 - 1 µl RT-Puffer
 - 2 µl MgCl₂ (25 mM)
 - 1 µl dNTP (je 10 mM dCTP, dGTP, dTTP, dATP)
 - 0,5 µl Primer reward
 - 0,2 µl RNAsin
 - 0,15 µl AMV-DNA Polymerase
 - 5,05 µl NFW
 - 0,1 µl Roh-RNA

Die RT lief in einem automatisierten Thermocycler (Mastercycler® gradient, eppendorf®) über 36 Minuten bei 42-48 °C (je 12 Minuten bei 42, 45 und 48 °C).

4.6.3.2. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ziel der PCR ist die Amplifikation einer DNA (in unserem Fall der in der reversen Transkription gebildeten cDNA). Die Amplifikation wurde mit Reagentien der Firma Quiagen durchgeführt.

- Standardansatz für die PCR einer Probe
 - 2,5 µl PCR-Puffer
 - 0,5 µl dNTP (je 10 mM dCTP, dGTP, dTTP, dATP)
 - 1,0 µl Primer forward
 - 1,0 µl Primer reward
 - 0,3 µl Taq DNA Polymerase
 - 18,7 µl NFW
 - 1 µl RT-Produkt

Im Thermocycler wurde die PCR mit folgendem Ablauf durchgeführt:

- | | |
|----------------|--------------|
| 1. Schmelzen: | 94 °C, 3,00' |
| 2. Schmelzen: | 94 °C, 20'' |
| 3. Annealing : | 54 °C, 20'' |

4. Extension: 72 °C, 45''
5. 34 Wiederholungen der Schritte 2. bis 4., insgesamt 35 Zyklen
6. Komplettierung 72 °C 1,30'

4.6.3.3. Die kompetitive RT-PCR

Die Genauigkeit der mRNA-Quantifizierung kann durch die Verwendung eines internen RNA-Standards enorm gesteigert werden. Für die kompetitive RT-PCR von CYP3A1-mRNA wurde eine Eich-RNA hergestellt (Glöckner et al. 2002), die bis auf eine Deletion um 68 Basenpaare identisch mit dem RT-PCR-Produkt von nativer CYP3A1-mRNA ist, somit eine Größe von 222 bp hat und durch dieselben Primer amplifiziert wird. Dadurch entstehen zwei RT-PCR-Produkte, die sich nach der Gelelektrophorese durch zwei Banden differenzieren lassen. In verschiedenen Konzentrationen zusammen mit den zu bestimmenden Proben eingesetzt, konkurriert diese Eich-RNA um die Primer und Oligonucleotide. Liegen native Cyp3A1-mRNA und Eich-RNA in gleichen Konzentrationen vor, so resultieren gleichgroße Mengen an RT-PCR-Produkten, es werden zwei gleichstarke Banden sichtbar, der Äquivalenzpunkt ist erreicht. Aus der bekannten Konzentration der Eich-RNA kann nun auf die Konzentration der Ziel-RNA geschlossen werden.

Der Standardansatz unterschied sich von dem der nichtkompetitiven RT-PCR durch Verwendung von 1 µl Eich-RNA in jeder Probe, ausgeglichen durch 1 µl weniger NFW.

4.6.4. Elektrophorese der RT-PCR-Produkte

Die durch die spezifische Primer bedingten PCR-Produkte aus nativer CYP3A1-cDNA und bei kompetitiver RT-PCR der Eich-RNA konnten mittels Gelelektrophorese im Vergleich zu DNA-Standards bekannter Größe (DNA-Leiter) nachgewiesen werden.

Für die Herstellung der Gele wurde Elektrophoresepuffer der folgenden Zusammensetzung verwendet:

- Elektrophoresepuffer-Stammlösung
 - Trishydroxymethylaminomethan 53,85 g/l
 - Orthoborsäure 27,60 g/l
 - Ethylendiamintetraessigsäure 3,72 g/l

Gebrauchslösung: 1:10-Verdünnung mit aqua bidest

Nach dem Aufkochen von 10 g Agarose in 500 ml Elektrophoresepuffer wurden 250 µl 0,1%ige Ethidiumbromid-Lösung unter ständigem Rühren zugefügt. War die Temperatur auf 65 °C gefallen, wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gefüllt und erstarrte bei Raumtemperatur.

Die PCR-Proben wurden mit Blaumarker (6 µl pro Tube), bestehend aus einem Gemisch von Frontmarker (Bromphenolblau) und Nachlaufmarker (Xylencyanol), versetzt und in die Geltaschen pipettiert (je 10 µl). Außerdem wurde bei jeder Elektrophorese eine DNA-Leiter mitgeführt.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Reaktionsprodukte wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

4.7. Statistik

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Darstellung der Versuchsergebnisse der Biotransformationsaktivitäten arithmetische Mittelwerte und deren Standardfehler errechnet. Der Stichprobenumfang betrug $n=6$ (unabhängige Schnittpräparation aus 6 Lebern). Der Studentsche t-Test für gepaarte Beobachtungen wurde zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse verwendet. Die Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen (Kontrollgruppen und induzierte Gruppen) erfolgte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$, wobei die jeweils zu vergleichenden Proben aus denselben Lebern stammten.

5. Ergebnisse

5.1. CYP3A1-Induktion in vitro durch Dex in Leberschnitten unbehandelter Ratten

In dieser Versuchsserie sollte zunächst die Ausgangssituation für die Wirkung von Dex allein auf die CYP3A1-Aktivität in vitro reproduziert werden. Weiterhin galt es, die Konzentrationsabhängigkeit mit Gewebe von weiblichen Tieren zu erstellen, da vor Versuchsbeginn nur Ergebnisse mit Leberschnitten männlicher Ratten vorlagen.

Bei den unbehandelten, ca. 40 Tage alten weiblichen Wistarratten wurden im Lebergewebe, das vor der Leberschnittpräparation entnommen worden war, relativ niedrige CYP3A1-Aktivitäten gemessen. Im Mittel betrugen sie $11,9 \pm 1,7$ (2 β -TH) bzw. $12,8 \pm 1,3$ (15 β -TH) pmol x min⁻¹ x mg Prot.⁻¹ (Bestimmung in insgesamt 20 Leberproben). Nach der Schnittinkubation über einen Zeitraum von 24 Stunden waren die Aktivitäten noch geringer (siehe Kontrollgruppen in Abbildung 5.1.).

Die In-vitro-Behandlung der Präzisionsleberschnitte mit Dex führte innerhalb von 24 Stunden zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der 2 β - und 15 β -TH gegenüber der Kontrollgruppe ohne Dex. Die Zugabe von 1 μ M Dex, der höchsten verwendeten Konzentration, zum Inkubationsmedium löste eine 17-fache Erhöhung der 2 β -TH und eine 8-fache Erhöhung der 15 β -TH gegenüber der Kontrollgruppe aus. Beide Aktivitäten waren damit deutlich höher als in unbehandelter Leber.

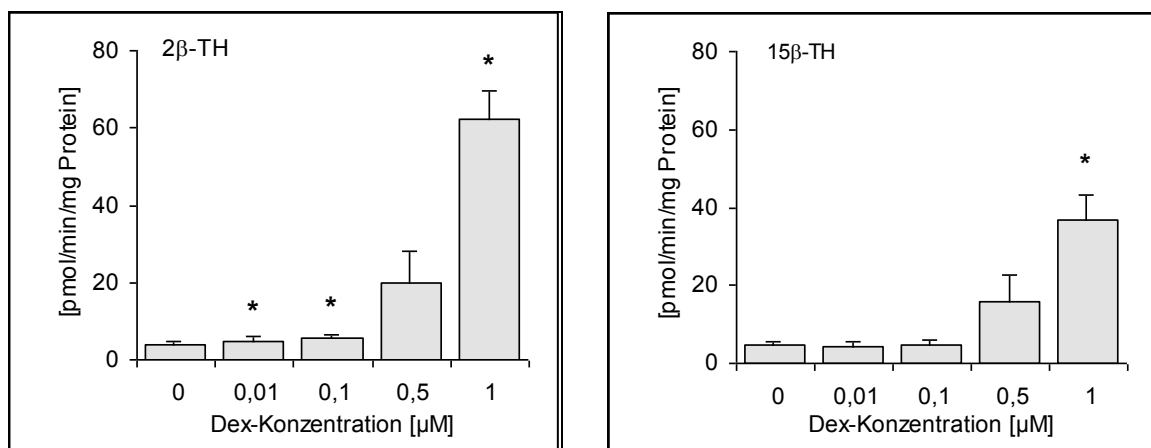


Abbildung 5.1.: 2 β - und 15 β -TH in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in vitro; Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern, n = 6; * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Dex (gepaarter t-Test, p ≤ 0,05)

5.2. CYP3A1-Induktion in vitro durch Dex in Leberschnitten PB-vorbehandelter Ratten

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sollten klären, inwieweit eine vorangegangene CYP2B-Induktion des Spendergewebes in vivo, ausgelöst durch PB, eine Rolle für die In-vitro-Testung eines potentiellen CYP3A1-Induktors (hier Dex als Modellinduktor) spielt.

5.2.1 Kontrolle des PB-Effekts: PROD-Aktivität

Zunächst wurde die CYP2B-Induktion durch PB in vivo überprüft. Die PROD-Aktivität, die in unbehandelter Leber ($n = 20$) $12,5 \pm 1,0 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Prot.}^{-1}$ betrug, war durch die 3-tägige PB-Vorbehandlung fast 40-fach angestiegen (siehe horizontale Linie in Abbildung 5.2.).

Diese PROD-Induktion fiel zwar im Verlauf der 24-stündigen Schnittinkubation ohne PB stark ab, war jedoch auch nach diesem Zeitraum immer noch deutlich sichtbar an viel höheren PROD-Aktivitäten als in unbehandelter Rattenleber. Durch Zusatz von Dex während der 24-stündigen Inkubation ließ sich eine geringe zusätzliche Steigerung der CYP2B-Induktion erreichen, die bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Dex das 1,4-fache betrug.

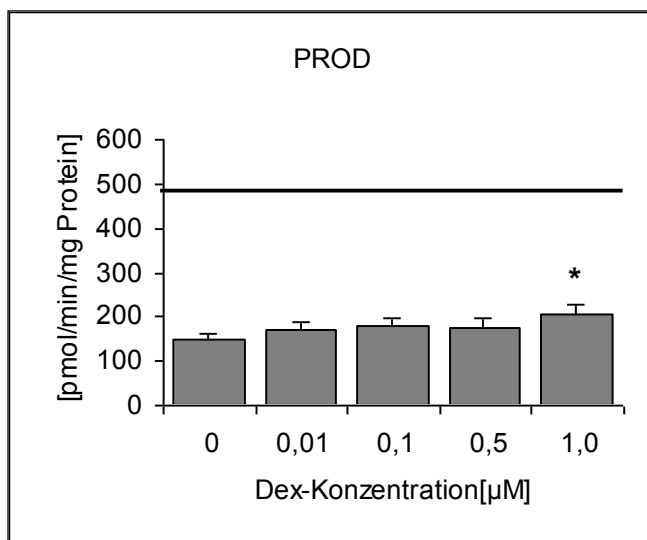


Abbildung 5.2.: CYP2B-abhängige PROD in Leberschnitten PB-vorbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in vitro, horizontale Linie = Aktivität in Lebergewebe (ex vivo) vor der Schnittpräparation, Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern, $n = 6$; * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Dex (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$)

5.2.2. Beeinflussung der CYP3A1-Aktivitäten

Auch die beiden CYP3A-abhängigen Aktivitäten waren durch PB in vivo erhöht worden. Im ungeschnittenen Lebergewebe ($n = 6$) betrugen sie 51 ± 9 (2β -TH) bzw. 46 ± 4 (15β -TH) $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Prot.}^{-1}$ und waren damit ca. 4-fach höher als in unbehandelter Leber (siehe Abschnitt 5.1.). Dieser Unterschied blieb auch in etwa in den Leberschnitten über 24 Stunden Inkubation erhalten.

Die konzentrationsabhängige Induktion der 2β - und 15β -TH durch Dex in vitro wurde nicht verhindert (Abbildung 5.3.). Gegenüber den Leberschnitten unbehandelter Versuchstiere wurden sogar höhere absolute Aktivitäten erreicht. Jedoch ergaben sich geringere mittlere Induktionsfaktoren. Im Einzelnen wurde mit einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Dex bei der 2β -TH eine fast 6-fach und bei der 15β -TH eine ca. 5-fach erhöhte Aktivität gegenüber der Kontrollgruppe ohne Dex erzielt.

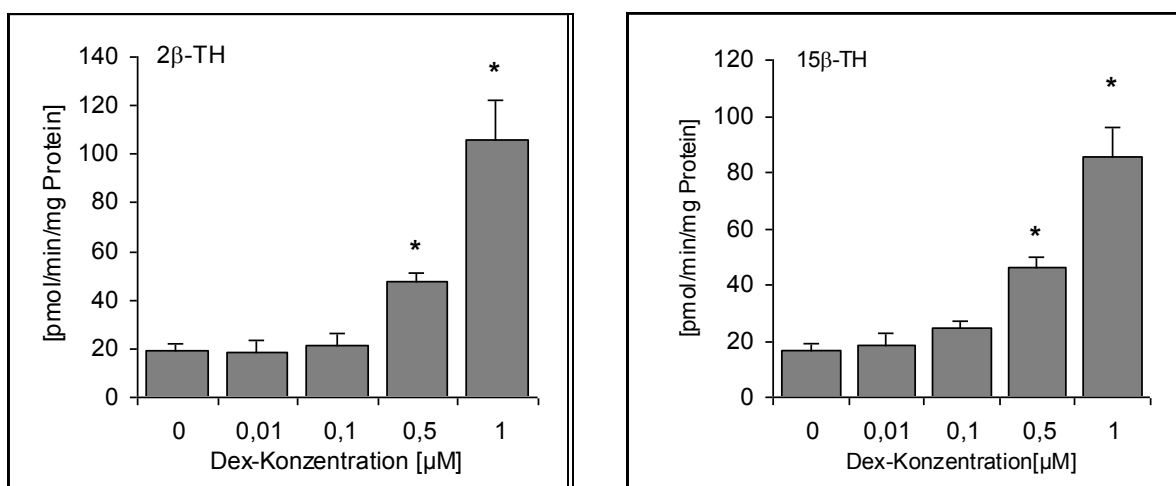


Abbildung 5.3.: 2β - und 15β -TH in Leberschnitten PB-vorbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in vitro, Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern, $n = 6$; * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Dex (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$)

5.2.3. Beeinflussung der CYP3A1-mRNA

Das für CYP3A1 spezifische RT-PCR-Produkt, bestehend aus 290 Basenpaaren, wurde zunächst semiquantitativ aus den Leberschnitten dreier stichprobenartig ausgewählter Tiere dieser Versuchsserie erfasst. Wie aus Abbildung 5.4. oben ersichtlich, war in Leberschnitten ohne Dex-Exposition eine geringere CYP3A1-mRNA-Expression vorhanden als nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in höheren Konzentrationen. Die In-vitro-Induktion mit Dex schien also nicht durch die PB-Vorbehandlung der Tiere behindert worden zu sein.

In Abbildung 5.4. unten sind die Ergebnisse der anschließenden kompetitiven RT-PCR ausgewählter Gruppen dargestellt. Die Absolutwerte der drei Tiere lagen in gleicher Größenordnung mit gewissen interindividuellen Unterschieden. Der Dex-Effekt ließ sich gut quantifizieren. Der mittlere Induktionsfaktor gegenüber den Proben ohne Dex betrug 6,0 bei 0,5 μM Dex und 13,5 bei 1 μM Dex. 0,1 μM Dex hatte keinen Induktionseffekt.

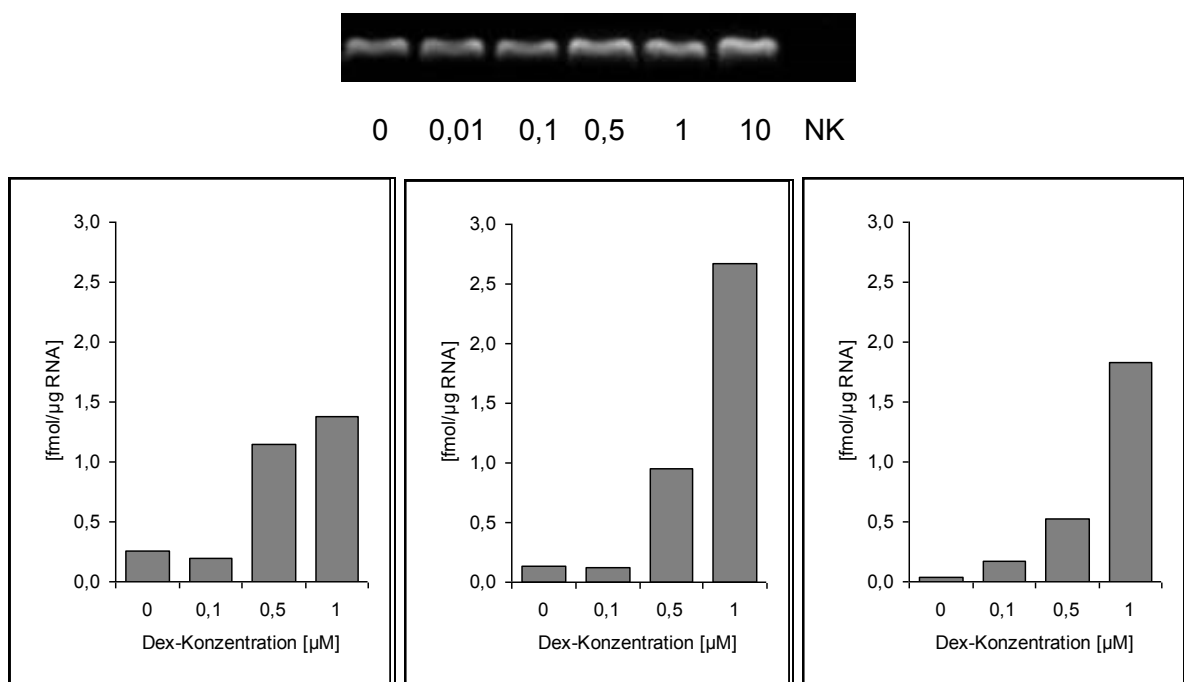


Abbildung 5.4.: CYP3A1-mRNA-Expression in Leberschnitten PB-vorbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in vitro

oben: Elektrophorese der spezifischen RT-PCR-Produkte (290 bp) von allen Gruppen eines Tieres; Angabe der Dex-Konzentration als Zahl unter den Banden, NK = Negativkontrolle

unten: CYP3A1-mRNA-Konzentration als Ergebnis kompetitiver RT-PCR, Darstellung der Einzelwerte von Leberschnitten dreier Tiere (ausgewählte Gruppen).

5.3. Einfluss von PB in vitro auf die CYP3A1-Induktion durch Dex in Leberschnitten unbehandelter Ratten

Anhand dieser Versuchsserie sollte aufgezeigt werden, ob an Leberschnitten durch Interaktionen zwischen CYP3A- und 2B-Induktoren (hier die Modellinduktoren Dex und PB) Veränderungen der CYP3A-Induzierbarkeit in vitro hervorgerufen werden im Vergleich zum alleinigen Einsatz des CYP3A-Induktors.

5.3.1. Dex-Exposition in vitro gleichzeitig mit PB

5.3.1.1. Kontrolle des PB-Effekts (5 und 100 μM): PROD-Aktivität

An den für 24 Stunden inkubierten Leberschnitten zeigte sich die erwartete Konzentrationsabhängigkeit der PB-Wirkung in vitro (Abbildung 5.5.).

Generell wurde durch die niedrige PB-Konzentration von 5 μM (in Abbildung 5.5. helle Säulen) keine oder nur eine geringe PROD-Steigerung erreicht, während durch Zugabe von 100 μM PB (in Abbildung 5.5. dunkle Säulen) eine stärkere PROD-Steigerung bewirkt wurde.

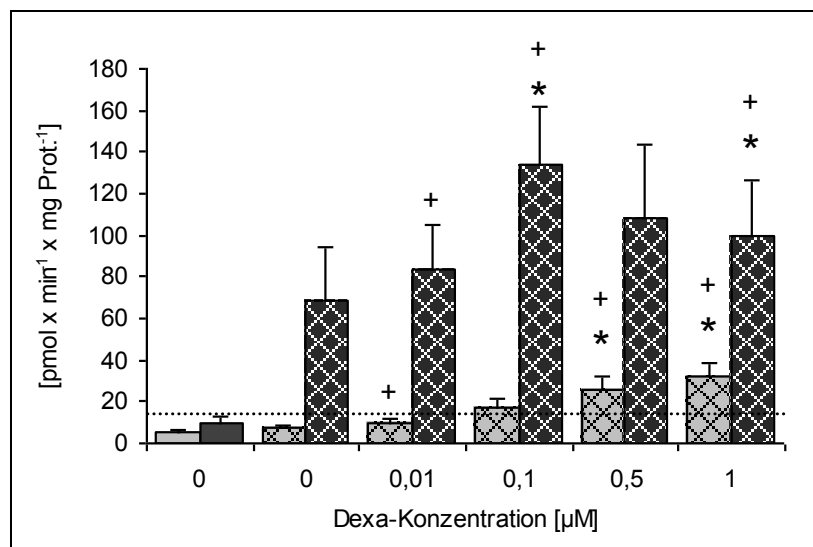


Abbildung 5.5.: CYP2B-abhängige PROD in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in vitro gleichzeitig mit PB (karierte Säulen), ungemusterte Säulen = Vergleichsgruppen ohne PB, PB-Konzentration 5 μM (helle Säulen) oder 100 μM (dunkle Säulen) in 2 unabhängigen Versuchsserien (je $n = 5$), horizontale Linie = mittlere PROD-Aktivität in unbehandelter Rattenleber vor der Schnittpräparation ($n = 20$); Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern; signifikanter Unterschied zur zugehörigen Kontrollgruppe ohne Zusätze (erstes Säulenpaar) = +, zur zugehörigen Gruppe mit PB ohne Dex (zweites Säulenpaar) = * (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$)

Mit 5 μM PB wurde im Mittel ohne Dex lediglich eine 1,4-fache, mit Dex eine bis zu 4,3-fache Steigerung der PROD erzielt. Offenbar verstärkte Dex die CYP2B-Induktion. Letzteres zu untersuchen, war aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Mit 100 μM PB ergab sich gegenüber der Kontrollgruppe ohne Zusätze durchschnittlich eine 7,5-fache Zunahme, wenn kein Dex enthalten war, mit gleichzeitiger Dex-Exposition aber ein PROD-Anstieg auf bis zu 14,5-fache Werte. Diese Steigerungen erreichten nicht immer das Signifikanzniveau, was höchstwahrscheinlich auf die großen interindividuellen Schwankungen zwischen den einzelnen Lebern mit Einzelfaktoren zwischen 4 und 70 zurückzuführen ist. Dex selbst hatte in einzelnen Gruppen wiederum eine zusätzlich verstärkende Wirkung auf die CYP2B-Induktion, die jedoch gegenüber der alleinigen PB-Wirkung hier weniger ins Gewicht fiel als mit der niedrigen PB-Konzentration.

5.3.1.2. CYP3A-Induktion bei Kombination von Dex mit 5 μ M PB

5.3.1.2.1. Beeinflussung der CYP3A1-Aktivitäten

5 μ M PB hatten allein keine nennenswerte Eigenwirkung auf die Bildung der beiden untersuchten Testosteronmetabolite (Abbildung 5.6.). In Kombination mit Dex wurde die konzentrationsabhängige Induktion der CYP3A1-katalysierten Reaktionen erneut sichtbar. Das gleichzeitige Vorhandensein von 5 μ M PB im Inkubationsansatz wirkte sich demnach nicht störend auf die Induzierbarkeit der 2 β - und 15 β -TH aus. 1 μ M Dex löste eine 18-fache Erhöhung der 2 β -TH und eine 10-fache Erhöhung der 15 β -TH gegenüber der PB-Kontrolle aus. Hierbei handelt es sich um ähnliche Induktionsfaktoren wie in 5.1 beschrieben mit Leberschnitten ohne gleichzeitige PB-Exposition.

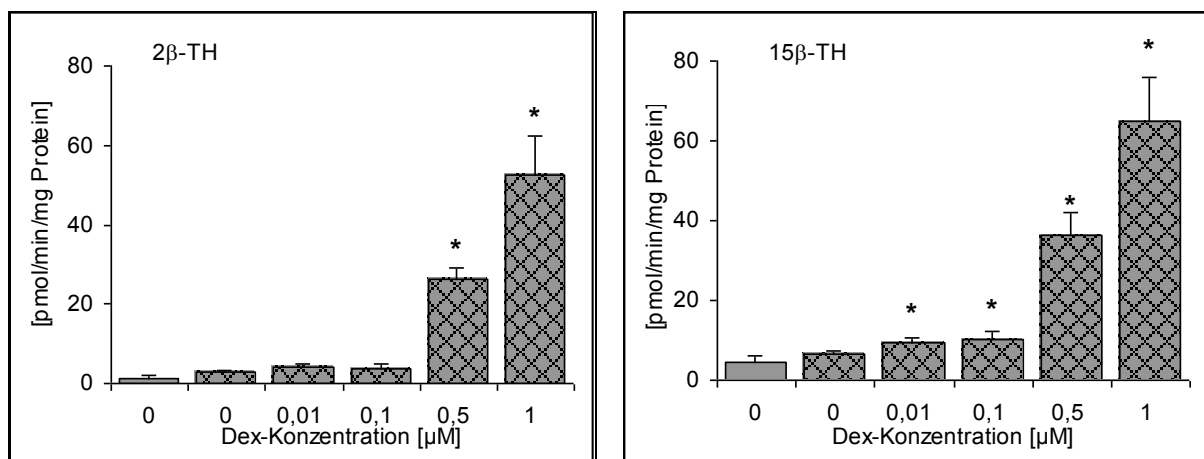


Abbildung 5.6.: 2 β - und 15 β -TH in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in vitro gleichzeitig mit 5 μ M PB (karierte Säulen), ungemusterte Säule = Vergleichsgruppe ohne PB; Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 5); * = signifikanter Unterschied zur PB-Gruppe ohne Dex (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$)

5.3.1.2.2. Beeinflussung der CYP3A1-mRNA

Schon bei der semiquantitativen Bestimmung der CYP3A1-mRNA (oberer Teil der Abbildung 5.7.) war die Zunahme der spezifischen RT-PCR-Produkte mit steigender Dex-Konzentration deutlich zu erkennen, und 5 μM PB allein hatten keinen erkennbaren Eigeneffekt. Auch bei der kompetitiven RT-PCR waren die CYP3A1-mRNA-Konzentrationen in den Proben beider Tiere niedrig, wenn kein Dex zugesetzt worden war, unabhängig davon, ob eine gleichzeitige PB-Exposition der Leberschnitte erfolgte oder nicht. Sie stiegen durch Dex-Exposition stark an und erreichten in allen betreffenden Gruppen Absolutwerte der gleichen Größenordnung. Ohne PB wurde eine 25- bzw. 48-fache, mit PB 9- bzw. 43-fache Zunahme gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe erreicht. In jedem Fall war der Dex-Effekt zweifelsfrei erkennbar.

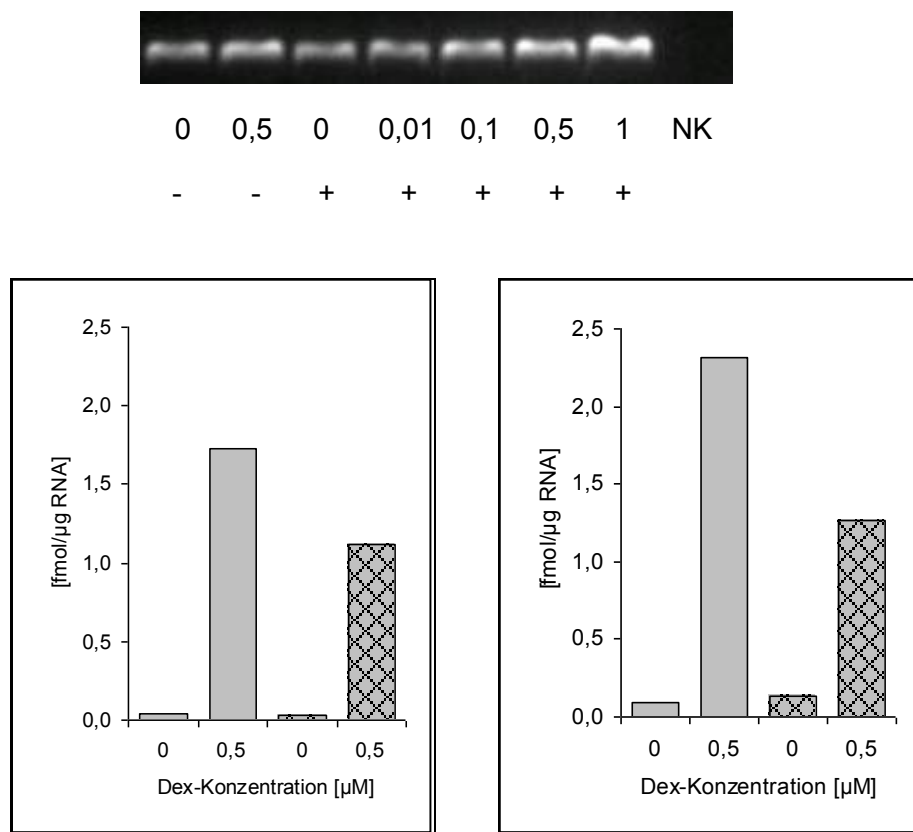


Abbildung 5.7.: CYP3A1-mRNA-Expression in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in vitro gleichzeitig mit 5 μM PB

oben: Elektrophorese der spezifischen RT-PCR-Produkte (290 bp) von allen Gruppen eines Tieres; Angabe der Dex-Konzentration als Zahl unter den Banden, NK = Negativkontrolle, + = Gruppe mit 5 μM PB

unten: CYP3A1-mRNA-Konzentration als Ergebnis kompetitiver RT-PCR, Darstellung der Stichproben aus 2 Lebern, ohne PB = ungemusterte Säulen, mit PB = karierte Säulen

5.3.1.3. CYP3A-Induktion bei Kombination von Dex mit 100 μM PB

5.3.1.3.1. Beeinflussung der CYP3A1-Aktivitäten

Wie Abbildung 5.8. zeigt, ähneln die bei der Kombination verschiedener Dex-Konzentrationen mit 100 μM PB erzielten Ergebnisse stark den oben beschriebenen Werten bei Zusatz der niedrigen PB-Konzentration. 100 μM PB allein hatten ebenfalls keine Eigenwirkung auf die CYP3A-Aktivitäten der Leberschnitte. Die konzentrationsabhängige Induktion durch Dex konnte belegt werden, ohne dass ein nennenswerter PB-Einfluss sichtbar wurde. Die Absolutwerte und die mittleren Induktionsfaktoren von fast 10 (2 β -TH) bzw. 7 (15 β -TH) lagen in ähnlicher Größenordnung wie durch Dex allein (siehe Abschnitt 5.1.) und durch Dex mit 5 μM PB (siehe Abschnitt 5.3.1.2.1.). Die CYP3A1-Induzierbarkeit wurde damit auch durch die Kombination mit 100 μM PB nicht beeinträchtigt.

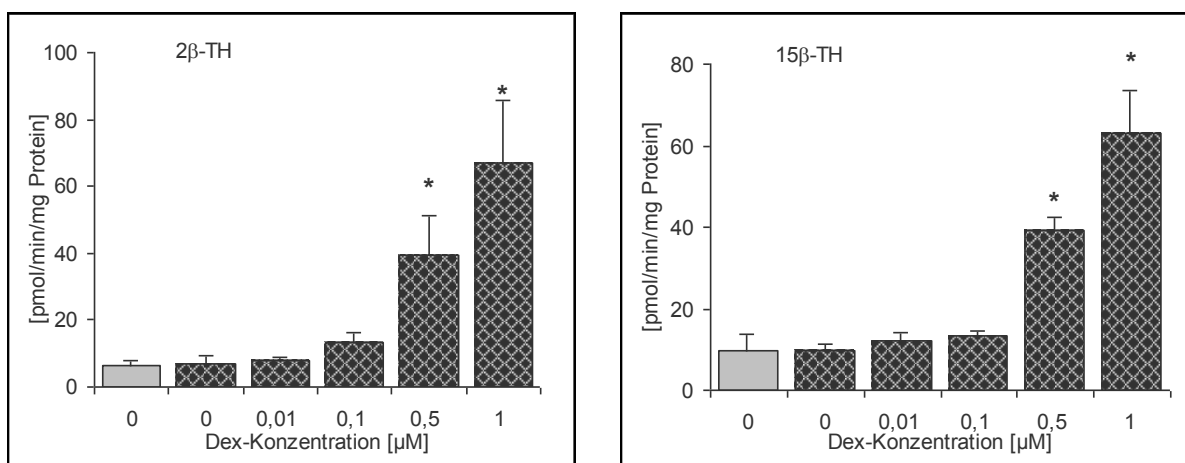


Abbildung 5.8.: 2 β - und 15 β -TH in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in vitro gleichzeitig mit 100 μM PB (karierte Säulen), ungemusterte Säule = Vergleichsgruppe ohne PB; Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern ($n = 5$); * = signifikanter Unterschied zur PB-Gruppe ohne Dex (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$)

5.3.1.3.2. Beeinflussung der CYP3A1-mRNA

Auch auf mRNA-Ebene zeigte sich erneut die konzentrationsabhängige Steigerung der CYP3A1-Expression durch Dex anhand der zunehmenden Bandenstärke für das spezifische RT-PCR-Produkt (Abbildung 5.9. oben). Wiederum war die CYP3A1-Expression unabhängig von PB niedrig in den Schnitten ohne Dex-Exposition und sicher induzierbar durch 0,5 μM Dex (Abbildung 5.9. unten). Der Zusatz der hohen PB-Konzentration schien die Expression der CYP3A1-mRNA (Absolutwerte) durch Dex nicht wesentlich zu beeinflussen oder sogar teilweise etwas zu begünstigen, ohne aber die Induzierbarkeit (Induktionsfaktoren) nennenswert zu verändern. Durch 0,5 μM Dex wurden Induktionsfaktoren von 10-12 (ohne PB) bzw. 8-14 (mit PB) erreicht.

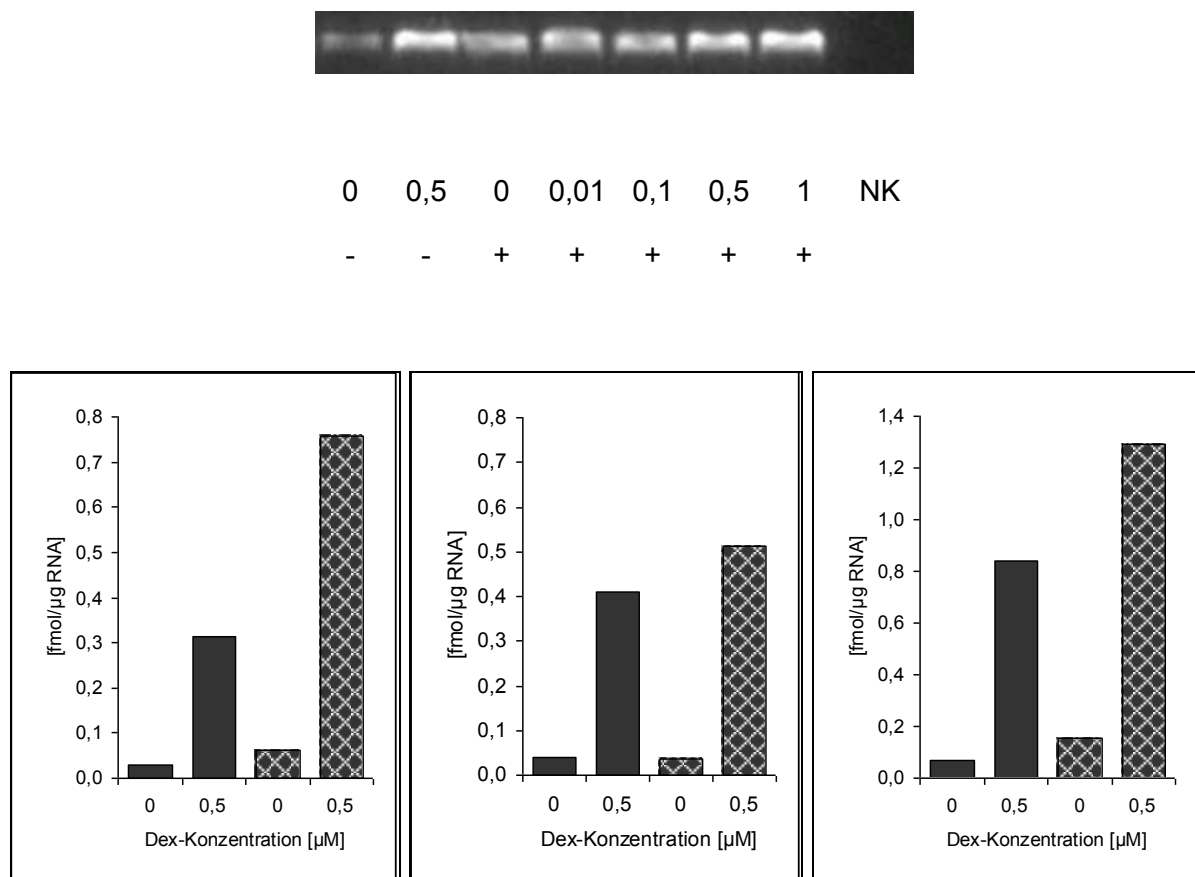


Abbildung 5.9.: CYP3A1-mRNA-Expression in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in vitro gleichzeitig mit 100 μM PB

oben: Elektrophorese der spezifischen RT-PCR-Produkte (290 bp) von allen Gruppen eines Tieres; Angabe der Dex-Konzentration als Zahl unter den Banden, NK = Negativkontrolle, + = Gruppe mit 100 μM PB

unten: CYP3A1-mRNA-Konzentration als Ergebnis kompetitiver RT-PCR, Darstellung der Stichproben aus 3 Lebern, ohne PB = ungemusterte Säulen, mit PB = karierte Säulen

5.3.2. Dex-Exposition in vitro nach vorangegangener PB-Exposition

Durch die sukzessive Einwirkung der beiden Modellinduktoren für jeweils 24 Stunden betrug die Inkubationszeit in diesen Versuchen 48 Stunden bei Beibehaltung der üblichen Dex-Expositionsdauer von 24 Stunden.

5.3.2.1. Kontrolle des PB-Effekts (5 und 100 μM): PROD-Aktivität

Der in den ersten 24 Stunden durch 5 μM ausgelöste PB-Effekt war erwartungsgemäß relativ gering und nicht signifikant (Abbildung 5.10., untere horizontale Linie). Während der anschließenden Inkubation (24-48 Stunden) war ebenfalls kein PB-Effekt sichtbar, wenn nicht höhere Dex-Konzentrationen zugesetzt wurden (Abbildung 5.10. helle Säulen). Durch 1 μM Dex war die PROD-Aktivität 4-fach gesteigert worden gegenüber der Gruppe nach PB allein ohne Dex, durch 0,5 μM Dex betrug die Steigerung immerhin das 2,5-fache, was ohne PB-Vorinkubation nicht auftrat. Eine Verstärkung des vorangegangenen PB-Effekts auf CYP2B durch Dex ist also anzunehmen.

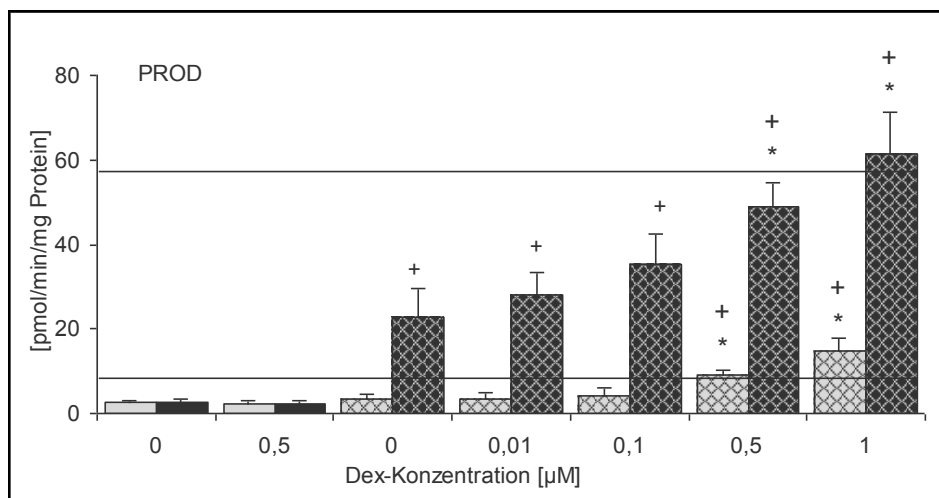


Abbildung 5.10.: CYP2B-abhängige PROD in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in vitro im Anschluss an eine 24-stündige PB-Exposition (karierte Säulen), ungemusterte Säulen = Vergleichsgruppen ohne PB-Exposition, PB-Konzentration 5 μM (helle Säulen) oder 100 μM (dunkle Säulen) in 2 unabhängigen Versuchsserien (je $n = 5$), Gesamtinkubation 48 Stunden, horizontale Linien = Aktivitäten unmittelbar nach der PB-, vor der Dex-Exposition (untere Linie nach 5 μM PB, obere Linie nach 100 μM PB); Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern; signifikanter Unterschied zur zugehörigen Kontrollgruppe ohne Zusätze (erstes Säulenpaar) = +, zur zugehörigen Gruppe nach PB ohne Dex (drittes Säulenpaar) = * (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$)

Ein ähnliches Bild stellte sich nach 100 μM PB auf höherem Aktivitätsniveau dar (Abbildung 5.10. dunkle Säulen). Die in den ersten 24 Stunden durch 100 μM PB ausgelöste PROD-Steigerung (in dieser Serie 22-fach) war nach weiteren 24 Stunden Inkubation in keiner Gruppe voll abgeklungen. Durch Dex allein ließ sich wiederum keine PROD-Steigerung erreichen, hingegen wurden nach PB mit Dex, abhängig von dessen Konzentration, höhere PROD-Aktivitäten als ohne Dex (bis 3-fach gegenüber der Gruppe nach PB allein) erzielt.

5.3.2.2. CYP3A-Induktion bei Kombination von Dex mit 5 μ M PB

5.3.2.2.1. Beeinflussung der CYP3A1-Aktivitäten

Aus Abbildung 5.11. geht hervor, dass sich für beide Modellreaktionen keine Auswirkungen der alleinigen PB-Präinkubation ergaben. Weiterhin wurde deutlich, dass auch nach einer 24-stündigen Vorinkubation mit 5 μ M PB die konzentrationsabhängige Induzierbarkeit von 2 β - und 15 β -TH-Aktivität durch Dex in vitro erhalten blieb. Die Untersuchungsergebnisse boten ein ähnliches Bild wie bei alleiniger Dex-Exposition (vgl. Abschnitt 5.1.) oder wie bei simultaner Einwirkung von Dex und PB (vgl. Abschnitt 5.3.1.) bei etwas niedrigeren Absolutwerten gegenüber diesen Versuchsserien.

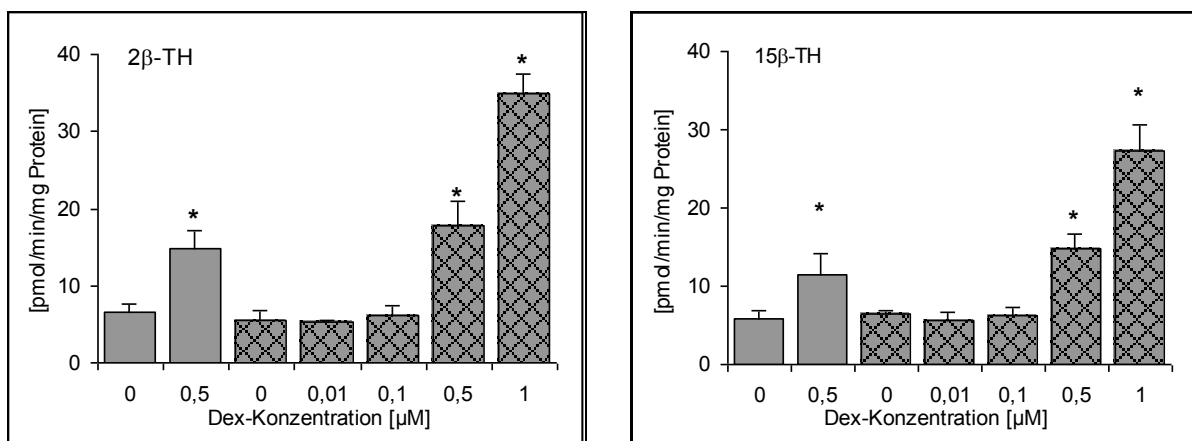


Abbildung 5.11.: 2 β - und 15 β -TH in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in vitro im Anschluss an eine 24-stündige Inkubation mit 5 μ M PB (karierte Säulen), ungemusterte Säulen = Vergleichsgruppen ohne PB-Exposition, Gesamtinkubation 48 Stunden; Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 5); * = signifikanter Unterschied zur zugehörigen Kontrollgruppe ohne Dex (gepaarter t-Test, p \leq 0,05)

5.3.2.2.2. Beeinflussung der CYP3A1-mRNA

Auch bei dieser Versuchsserie mit sukzessivem Einwirken von 5 μM PB und Dex stimmten die Befunde auf mRNA-Ebene mit denen auf Aktivitätsebene überein, indem die konzentrationsabhängige Zunahme der CYP3A1-mRNA-Expression sichtbar wurde, ohne dass ein PB-Effekt erkennbar war (Abbildung 5.12. oben).

Bei der Quantifizierung ausgewählter Gruppen (Abbildung 5.12. unten) wurde wiederum die sichere Induzierbarkeit trotz PB-Präinkubation bestätigt. Bei einer der beiden Stichproben schien sogar eine leichte Verstärkung durch PB aufzutreten. Die Absolutwerte aller Proben lagen in der gleichen Größenordnung, und auch die Induktionsfaktoren von 20 bzw. 13 (ohne PB-Präexposition) und 34 bzw. 31 (mit PB-Präexposition) entsprachen etwa denen der anderen Versuchsserien.

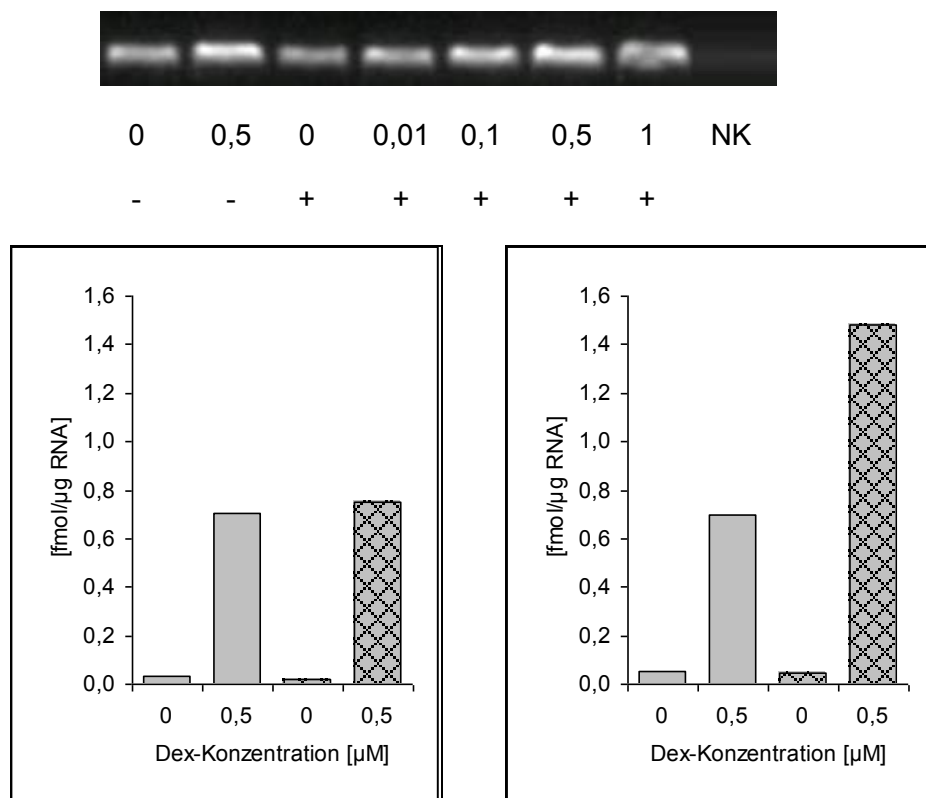


Abbildung 5.12.: CYP3A1-mRNA-Expression in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in vitro im Anschluss an eine 24-stündige Inkubation mit 5 μM PB, Gesamtinkubation 48 Stunden

oben: Elektrophorese der spezifischen RT-PCR-Produkte (290 bp) von allen Gruppen eines Tieres; Angabe der Dex-Konzentration als Zahl unter den Banden, + = Gruppen nach PB-Exposition, NK = Negativkontrolle

unten: CYP3A1-mRNA-Konzentration als Ergebnis kompetitiver RT-PCR, Darstellung der Stichproben aus 2 Lebern, Präinkubation ohne PB = ungemusterte Säulen, Präinkubation mit 5 μM PB = karierte Säulen

5.3.2.3. CYP3A-Induktion bei Kombination von Dex mit 100 μ M PB

5.3.2.3.1. Beeinflussung der CYP3A1-Aktivitäten

Auch beim sukzessiven Einsatz von PB und Dex in vitro stimmten die Ergebnisse mit 5 und 100 μ M PB im Wesentlichen überein, wie dies schon beim Simultaneinsatz mit beiden PB-Konzentrationen der Fall war (siehe Abschnitt 5.3.1.). Eine Präinkubation mit 100 μ M PB allein hatte auch hier keinen Einfluss auf die CYP3A-Aktivität (Abbildung 5.13.). Die CYP3A-Induktion war ungehindert durch Dex auslösbar. Die Induktionsfaktoren betrugen mit den beiden höchsten Dex-Konzentrationen 4-5 für 2 β -TH und 3-4 für 15 β -TH gegenüber der Gruppe nach PB allein. Sie lagen damit in einer ähnlichen Größenordnung wie bei Leberschnitten PB-vorbehandelter Tiere (vgl. Abschnitt 5.2.), jedoch etwas niedriger als in den Versuchsreihen ohne PB (siehe Abschnitt 5.1.) oder mit simultanem Einwirken von PB und Dex (siehe Abschnitt 5.3.1.).

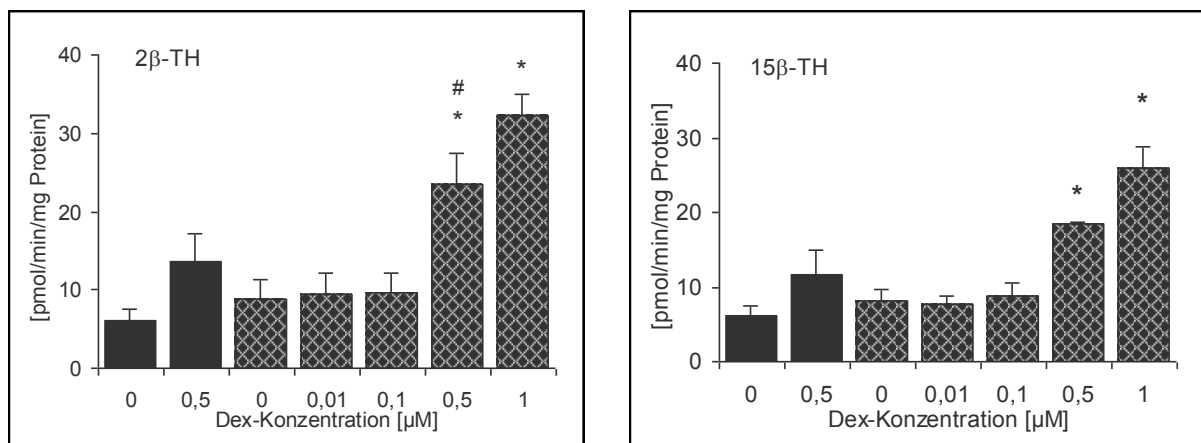


Abbildung 5.13.: 2 β - und 15 β -TH in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in vitro im Anschluss an eine 24-stündige Inkubation mit 100 μ M PB (karierte Säulen), ungemusterte Säulen = Vergleichsgruppen ohne PB-Exposition, Gesamtinkubation 48 Stunden; Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern (n = 5); signifikanter Unterschied zur zugehörigen Kontrollgruppe ohne Dex = *, zur Gruppe mit 0,5 μ M Dex allein ohne PB-Vorinkubation) = # (gepaarter t-Test, p \leq 0,05)

5.3.2.3.2. Beeinflussung der CYP3A1-mRNA

Auch auf mRNA-Ebene blieb die konzentrationsabhängige CYP3A1-Induzierbarkeit durch Dex in vitro trotz Präinkubation mit 100 μM PB uneingeschränkt nachweisbar (Abbildung 5.14.). In den untersuchten Stichproben ließ sich wie schon nach der Einwirkung von 5 μM PB (siehe Abschnitt 5.3.2.2.2.) nun ebenfalls kein nennenswerter Eigeneffekt von 100 μM PB erkennen (etwa gleiche Bandenstärke und gleich niedrige CYP3A1-Konzentration in beiden Gruppen ohne Dex). Wiederum lagen unabhängig von einer Präinkubation ohne oder mit PB die Absolutwerte aller Dex-exponierten Proben in der gleichen Größenordnung bei reproduzierbaren Induktionsfaktoren von 13-20 durch 0,5 μM Dex.

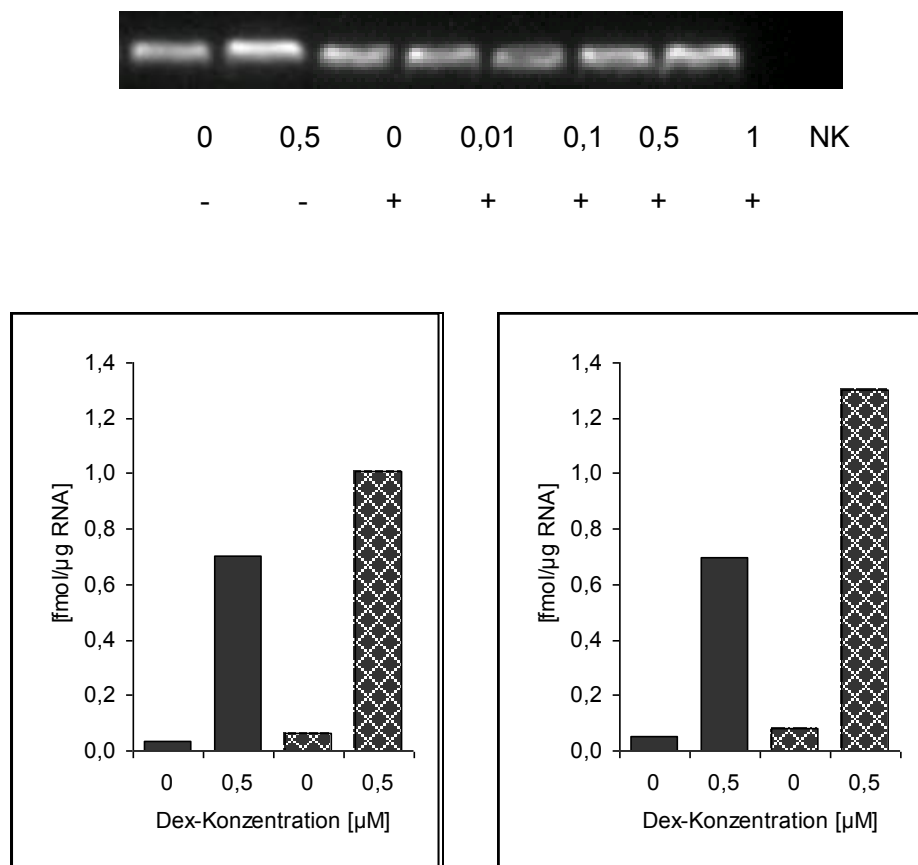


Abbildung 5.14.: CYP3A1-mRNA-Expression in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Dex in vitro im Anschluss an eine 24-stündige Inkubation mit 100 μM PB, Gesamtinkubation 48 Stunden

oben: Elektrophorese der spezifischen RT-PCR-Produkte (290 bp) von allen Gruppen eines Tieres; Angabe der Dex-Konzentration als Zahl unter den Banden, + = Gruppen nach PB-Exposition, NK = Negativkontrolle

unten: CYP3A1-mRNA-Konzentration als Ergebnis kompetitiver RT-PCR, Darstellung der Stichproben aus 2 Lebern, Präinkubation ohne PB = ungemusterte Säulen, Präinkubation mit 100 μM PB = karierte Säulen

6. Diskussion

Das Hauptanliegen dieser Dissertation war die Untersuchung der CYP3A1-Induktion *in vitro* in Rattenleberschnitten mit dem Modellinduktor Dex in Kombination mit PB, um zu klären, ob und inwieweit eine CYP2B-Induktion, ausgelöst durch den Modellinduktor PB, die CYP3A1-Induzierbarkeit *in vitro* beeinflussen kann. In den einzelnen Versuchsreihen wurde PB dabei sowohl zur Vorbehandlung der Versuchstiere *in vivo* appliziert, deren Lebern dann zur Schnittpräparation und *In-vitro*-Induktion verwendet wurden, als auch *in vitro* vor oder simultan mit Dex eingesetzt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Nachweis einer CYP3A1-Induktion in Präzisionsleberschnitten selbst unter Bedingungen einer vorangegangenen oder gleichzeitigen CYP2B-Induktion uneingeschränkt möglich ist. Dies trifft sowohl auf die Enzymaktivitäts- als auch auf die mRNA-Ebene zu.

Im Anschluss folgt die ausführliche Diskussion der Befunde der einzelnen Versuchsserien.

6.1. CYP3A1-Induktion *in vitro* durch Dex in Leberschnitten unbehandelter Ratten

Zunächst sollte die Ausgangssituation für die Wirkung von Dex allein auf die CYP3A1-Aktivität *in vitro* reproduziert werden. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die CYP3A1-Induktion durch Dex mittels 2 β - und 15 β - TH in Leberschnitten weiblicher Ratten besser nachzuweisen ist als in Proben der männlichen Artgenossen, da deren Basalaktivitäten sehr niedrig sind (Glöckner et al. 2003, 2008). Letzteres bestätigte sich in den durchgeführten Versuchen im Lebergewebe, welches vor der Schnittpräparation entnommen wurde (siehe Abschnitt 5.1.). Die entsprechenden Aktivitäten lagen in der gleichen Größenordnung wie in vorangegangenen Versuchen (Demirdag 2010).

Auch die Basalaktivitäten in Leberschnitten, die bereits 24 Stunden inkubiert worden waren (siehe Abschnitt 5.1., Abbildung 5.1.), korrelieren gut mit früheren Ergebnissen aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie Jena (Lieder et al. 2002, Glöckner et al. 2003, Reinhardt 2009, Demirdag 2010, Rohländer 2011). Sie lagen stets im Bereich von 5-10 pmol/min/mg Protein und waren damit erwartungsgemäß noch etwas niedriger als in Lebergewebe *ex vivo* vor der Schnittpräparation.

Vergleiche mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen sind nicht möglich, da keine Bestimmungen der 2 β - und 15 β -TH unter ähnlichen Bedingungen vorliegen.

Am gut standardisierten Rattenleberschnitt war bereits eine In-vitro-Induzierbarkeit des CYP3A1 mit Dex gezeigt worden (Glöckner et al. 2003). Auch in den eigenen Versuchen führte die In-vitro-Behandlung des Gewebes mit Dex innerhalb von 24 Stunden zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der 2 β - und 15 β -TH gegenüber der Kontrollgruppe ohne Dex. Durch 0,5 μ M Dex wurde das Signifikanzniveau für die Induktion noch nicht ganz erreicht, obgleich bereits eine Steigerung deutlich erkennbar war. Bei Demirdag (2010) war mit dieser Dex-Konzentration schon ein signifikanter 2 β - und 15 β -TH-Anstieg erzielt worden. Hier mögen individuelle Unterschiede der Versuchstiere (kleinere Abweichungen der Basalaktivitäten als Bezugsgröße) eine Rolle spielen.

Die durch 1 μ M Dex erreichbaren CYP3A1-Aktivitäten, die bei der 2 β -TH ca. 60 pmol/min/mg Prot. betragen (siehe Abschnitt 5.1., Abbildung 5.1.), entsprechen den Erfahrungen früherer Untersuchungen (Glöckner et al. 2008, Reinhardt 2009, Demirdag 2010, Rohländer 2011). Das trifft auch auf die Induktionsfaktoren zu. Eine 17-fache Erhöhung der 2 β -TH und eine 8-fache Erhöhung der 15 β -TH wurde durch die Zugabe von 1 μ M Dex zum Inkubationsmedium gegenüber der Kontrollgruppe erzielt. Demirdag (2010) kam zu nahezu identischen Ergebnissen (17-fache Erhöhung der 2 β -TH, 7-fache Erhöhung der 15 β -TH). Beide Aktivitäten waren damit deutlich höher als in unbehandeltem Lebergewebe. Bei Rohländer (2011) wurden für die 2 β -TH Induktionsfaktoren zwischen 13 und 18 bei Verwendung von 1 μ M Dex beschrieben, bei Glöckner et al. (2008) und Reinhardt (2009) waren die Faktoren etwas niedriger (unter 10) bei etwas höheren Basalaktivitäten. Es hat sich bestätigt, dass die 2 β - und 15 β -TH geeignete Modellreaktionen darstellen, um die Wirkung von Dex zu untersuchen.

Aus anderen Arbeitsgruppen sind kaum Untersuchungen der CYP3A-Induktion mit Dex in vitro an Leberschnitten veröffentlicht. Bei Martignoni et al. (2004) wurde an Leberschnitten männlicher Ratten durch 100 μ M Dex innerhalb von 48 Stunden eine ca. vierfache Erhöhung der 6 β -TH erzielt. Bei Wauthier et al. (2004), die ebenfalls Leberschnitte männlicher Ratten verwendeten, wurde durch 10 μ M Dex eine ca. fünffache Steigerung des CYP3A1-Gehaltes innerhalb von 24 Stunden ausgelöst. Beide Ergebnisse sind zwar wegen völlig anderer Versuchsbedingungen nur

eingeschränkt mit den eigenen Ergebnissen vergleichbar, widersprechen diesen aber nicht. Ebenso verhält es sich mit zahlreichen Befunden, die mit isolierten Hepatozyten von Ratte und Mensch erhoben wurden und die konzentrationsabhängige CYP3A-Induktion durch Dex in vitro verdeutlichen. Jedoch ist der Vergleich mit diesem In-vitro-Modell zusätzlich erschwert, da hier dem Inkubationsmedium zum Erhalt der Hepatozytenfunktion routinemäßig Dex in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wird. Als Beispiel seien Meunier et al. (2000) genannt, die nach 72-stündiger Einwirkung von 1 μM Dex eine 3-fache, bei 50 μM Dex eine 3,8-fache und bei 100 μM Dex eine 6-fache Steigerung der CYP3A-abhängigen Nifedipin-Dehydrogenierung nachgewiesen konnten.

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine CYP3A1-Induktion durch die Einwirkung von Dex allein auch auf der mRNA-Ebene gut nachweisbar ist. Für die Kontrollserie (dargestellt in Abschnitt 5.1.) wurden zwar keine separaten mRNA-Bestimmungen vorgenommen, aber es liegen Werte aus den im Abschnitt 5.3. dargestellten Versuchen vor. Durch 0,5 μM Dex war nach 24-stündiger Inkubation eine im Durchschnitt 24-fache Expressionssteigerung nachweisbar. Von Demirdag (2010) wurde mit 1 μM Dex ebenfalls ein Induktionsfaktor von 24 bei Verwendung von Leberschnitten weiblicher Ratten nachgewiesen.

In vorausgehenden Studien wurde dieser Aspekt häufig an männlichen Versuchstieren untersucht, jedoch zeigen Literaturdaten (Bjornsson et al. 2003, Glöckner et al. 2003), dass die CYP3A1-mRNA-Induktion bei Ratten unabhängig vom Geschlecht stattfindet. So sind die eigenen Befunde von weiblichen Ratten gut mit denen von männlichen Ratten (Glöckner et al. 2003) vergleichbar. Martignoni et al. (2004) wiesen eine rund 70-fache CYP3A1-mRNA-Induktion in Rattenleberschnitten durch 100 μM Dex gegenüber Kontrollen mit DMSO nach, wobei ein direkter Vergleich der Daten nicht möglich ist, da die Methode der real time RT-PCR Verwendung fand und somit keine Aussagen zu Absolutwerten der mRNA gemacht werden können. Cui et al. (2005) verwendete Dex-Konzentrationen von 3-30 μM und erzielte damit eine 30- bis 50-fache Expressionssteigerung, Khan et al. (2009) setzten 1-50 μM Dex ein, was zu einem 2- bis 9-fachen Anstieg der CYP3A1-Expression führte (ebenfalls Verwendung der real time RT-PCR). Demnach liegen die Literaturbefunde in der gleichen Größenordnung wie die hier vorgestellten eigenen Ergebnisse.

Auch an Hepatozytenkulturen weiblicher Ratten wurde die CYP3A1-Induzierbarkeit auf mRNA-Ebene nachgewiesen, wobei die Induktionsfaktoren zumeist niedriger lagen als bei Verwendung von Leberschnitten. Als Beispiel seien Surry et al. (1999) angeführt, die nach 24-stündiger Inkubationszeit eine 2,5- bis 3-fache CYP3A1mRNA-Induktion durch 10 μ M Dex erzielten.

Insgesamt konnte mit den eingangs durchgeführten Kontrollversuchen belegt werden, dass eine CYP3A1-Induktion in vitro mit Rattenleberschnitten sowohl auf Enzymaktivitäts- als auch auf mRNA-Ebene sicher und gut reproduzierbar durch Dex ausgelöst wurde. Dies stellte die Grundlage für die vorgesehenen Kombinationsversuche dar.

6.2. CYP3A1-Induktion in vitro durch Dex in Leberschnitten PB-vorbehandelter Ratten

Es ist durchaus möglich, dass humanes Lebergewebe, welches zur In-vitro-Untersuchung der Biotransformation herangezogen werden soll, schon in vivo CYP2B-induzierenden Substanzen, wie zum Beispiel bestimmten Antiepileptika oder Antihistaminika, ausgesetzt war. Daher macht es Sinn, den Einfluss des CYP2B-Expressionszustandes von Lebergewebe auf zu prüfende Funktionen in vitro, hier auf die CYP3A1-Induzierbarkeit, systematisch im Tierversuch zu untersuchen. Dazu wurde eine Vorbehandlung mit dem CYP2B-Modellinduktor PB vorgenommen.

Zunächst erfolgte der Nachweis der in vivo stattgefundenen CYP2B-Induktion mittels PROD als Modellreaktion. Durch 3-tägige PB-Vorbehandlung weiblicher Ratten wurde die PROD-Aktivität fast 40-fach gesteigert (siehe Abschnitt 5.2., Abbildung 5.2.) und lag damit in der gleichen Größenordnung wie bei anderen Untersuchungen an männlichen Ratten unter fast identischen oder auch etwas abweichenden Bedingungen bezüglich Dosierung und Applikationsdauer (Lerch 2008, Whysner et al. 1996).

Auch das Abklingen dieser PROD-Induktion in den Leberschnitten innerhalb einer 24-stündigen Inkubation (von ca. 480 auf ca. 150 pmol/min/mg Prot., siehe Abbildung 5.2.) entspricht den Erfahrungen aus früheren Untersuchungen (Lerch 2008, Müller et al. 2000). Trotz dieses Absinkens der in vivo induzierten CYP2B-Aktivität waren immer noch deutlich höhere PROD-Aktivitäten im Vergleich zu Gewebeproben unbehandelter Versuchstiere vorhanden. Letztere betrugen lediglich 8 ± 2 pmol/min/mg Prot., ermittelt aus mitgeführten Kontrollgruppen der anderen

Versuchsserien ($n = 20$). Auch diese Verhältnisse entsprechen den Befunden vorausgegangener Untersuchungen (Lerch 2008, Rohländer 2011, Stahmann 2003). Es war somit gewährleistet, dass der erwartete PB-Effekt in ausreichendem Maße vorlag, um seinen Einfluss auf die anschließende In-vitro-Testung eines potentiellen CYP3A1-Induktors untersuchen zu können.

Als Nebenbefund wurde durch Zusatz von Dex während der 24-stündigen Inkubation eine geringe zusätzliche Steigerung der CYP2B-Aktivität gegenüber der Kontrollgruppe ohne Dex beobachtet, die bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Dex das 1,4-fache betrug und sogar das Signifikanzniveau erreichte. Der Einfluss von Dex auf die CYP2B-Aktivität und -Induzierbarkeit war nicht Gegenstand dieser Arbeit, sondern wurde in der Arbeit von Rohländer (2011) genauer untersucht. Wie dort ausführlicher beschrieben und diskutiert, kann Dex zwar selbst in höheren Konzentrationen eine gewisse CYP2B-Induktion auslösen. In Kombination mit PB besitzt der CYP3A-Induktor Dex auch auf die Bildung von CYP2B begünstigende Effekte, vor allem in niedrigen Konzentrationen. Laut Literatur wurde dies z. B. von Ringel et al. (2002) an Hepatozytenkulturen von Ratten beobachtet, wobei sich der permissive Effekt des Glucocorticoids durch Erhöhung der Dex-Konzentration abschwächte oder ganz verschwand. Jedoch ist es bei den eigenen Befunden wahrscheinlicher, dass durch den Dex-Zusatz das Abklingen der in vivo stattgefundenen CYP2B-Induktion verzögert wurde. In Leberschnitten unbehandelter Ratten führte Dex allein in vitro ($1 \mu\text{M}$) zumeist nicht zu einer PROD-Steigerung (Rohländer 2011). Dies zeigte sich auch bei den Versuchen des Abschnitts 5.3.2. (siehe Abbildung 5.10.) und wurde darüber hinaus in einigen sporadisch mitgeführten eigenen Proben bestätigt ($n = 8$, im Ergebnisteil nicht dargestellt), wonach die PROD nach 24-stündiger Schnittinkubation ohne Dex $8,0 \pm 2,1 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Prot.}^{-1}$ und mit $0,5 \mu\text{M}$ Dex $12,7 \pm 2,6 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Prot.}^{-1}$ betrug. Ein vergleichbarer Befund war von Demirdag (2010) erhoben worden, bei dem das Abklingen einer CYP1A1-Induktion durch Dex-Zusatz verzögert wurde. Möglicherweise steht die protektive Wirkung des Glucocorticoids im Vordergrund. Verschiedene Autoren schrieben Dex eine stabilisierende Funktion und antiapoptotische Wirkung zu (Waxman et al. 1990, Silva et al. 1998, Wanke et al. 2004). Laishes und Williams (1976) wiesen eine Verlängerung der Lebenszeit von Zellen in Hepatozytenkulturen durch den Zusatz von $1 \mu\text{M}$ Dex zum Medium nach.

Es war nun die CYP3A1-Induzierbarkeit unter diesen Bedingungen der gesteigerten CYP2B-Expression zu untersuchen.

Zunächst waren die CYP3A1-abhängigen 2 β - und 15 β -Basalaktivitäten im Lebergewebe PB-vorbehandelter Weibchen vor der Schnittpräparation und -inkubation erfasst worden, die etwa 50 pmol/min/mg Prot. betrugten (siehe Abschnitt 5.2.2.) und damit um einen Faktor von ca. 4 gegenüber unbehandelter Leber (etwa 12 pmol/min/mg Prot., siehe Abschnitt 5.1.) erhöht waren. Die durch PB bedingte Steigerung der CYP3A-Aktivität fiel also erwartungsgemäß deutlich geringer aus als die ca. 40-fache CYP2B-Induktion. Dies steht im Einklang mit der Literatur (z. B. Nagata et al. 1990, Larsen et al. 1994, Waxman 1999, Lambert et al. 2009). Erklärbar ist die CYP3A1-Induktion durch PB mit einer Vernetzung der Induktionswege der verschiedenen CYP-Klassen durch gemeinsame Nutzung von Signaltransduktionswegen, was als Cross Talk bezeichnet wird (Honkakoski und Negishi 2000, Pelkonen et al. 2008). Für PB wurde eine induktive Wirkung auf bis zu 200 Gene beschrieben (Handschin und Meyer 2003). Waxman (1999) berichtete von einer 2- bis 4-fachen Induktion von CYP3A-Genen bei Ratten durch PB. Larsen et al. (1994) erreichten durch dreimalige intraperitoneale Applikation von 60 mg PB an weiblichen Ratten, also die gleiche Vorbehandlung wie in vorliegender Dissertation, eine CYP3A1-Induktion auf Aktivitäts-, Protein- und mRNA-Ebene. Es wurden jedoch keine Absolutwerte angegeben.

Während der nun folgenden 24-stündigen Schnittinkubation kam es zu einem Abklingen der durch PB in vivo induzierten CYP3A-Biotransformationsaktivität. Jedoch war der Rückgang der 2 β - und 15 β -TH nicht vollständig, sondern die Werte betrugen ohne Dex-Zusatz immer noch mehr als ein Drittel derjenigen von frisch entnommenem Lebergewebe (siehe Abbildung 5.3.). Im Vergleich zu inkubierten Leberschnitten unbehandelter Ratten (siehe Abschnitt 5.1.) waren die Aktivitäten ca. 4-fach erhöht, d.h. die Relation zwischen CYP3A-Aktivitäten in Lebergewebe PB-behandelter und unbehandelter Tiere hatte sich während der Schnittinkubation kaum verändert. Vergleichbare Literatur über die Dauerhaftigkeit einer durch PB-Vorbehandlung ausgelösten CYP3A-Induktion in Rattenlebergewebe in vivo, in Leberschnitten oder anderen In-vitro-Systemen liegt nicht vor. Es ist lediglich bekannt, dass das Abklingen einer CYP3A-Induktion (2 β -, 6 β - und 15 β -TH-Aktivitäten) nach Dex-Vorbehandlung innerhalb von 24 Stunden in vitro (Leberschnitte) mehr oder weniger vollständig vonstattengeht (Lieder 2007,

Reinhardt 2009, Rohländer 2011) im Unterschied zum langsameren Abklingen einer PB-bedingten CYP2B-Induktion (s. o.). Ein Grund hierfür könnte in unterschiedlichen CYP-Halbwertszeiten und -Abbauwegen zu finden sein. Die CYP3A-Eiweiße werden proteasomal abgebaut, die Halbwertszeit wurde von Watkins et al. (1986) mit 14 Stunden beziffert. Hingegen werden CYP2B-Proteine lysosomal abgebaut und weisen eine längere Halbwertszeit auf (Correia und Liao 2007). Es wäre aber auch denkbar, dass der bekannte proliferative Effekt von PB *in vitro* nachwirkt, ein besseres Überleben der Leberschnitte bedingt und dadurch zu höheren Aktivitäten nicht nur von CYP2B beiträgt, wie es bereits von Lupp et al (2001) und Stahmann (2003) diskutiert wurde. In jedem Fall bleibt festzuhalten, dass sich die durch Dex *in vitro* hervorzurufende CYP3A-Induktion auf eine bereits erhöhte Aktivität aufpfropft, welche auf PB *in vivo* zurückzuführen ist.

Auf mRNA-Ebene wurde die CYP3A1-Expression nicht an ungeschnittenen Gewebeproben ermittelt, sondern erst nach 24 Stunden Schnittinkubation. Dabei wurde zwischen den wenigen Leberschnitt-Stichproben PB-behandelter ($n = 3$, siehe Abbildung 5.4.) und unbehandelter Lebern ($n = 5$, siehe Abbildung 5.7. und 5.9.) kein Unterschied offensichtlich. Die Berechnung von mittleren Induktionsfaktoren ist hier nicht sinnvoll, da bekanntermaßen große interindividuelle Unterschiede auf mRNA-Ebene bestehen und auch mit methodisch bedingten Schwankungen von Ansatz zu Ansatz gerechnet werden muss. Es ist zu vermuten, dass unmittelbar nach Gewebeentnahme eine Erhöhung der CYP3A1-mRNA vorlag, die dann *in vitro* innerhalb von 24 Stunden vollständig abklang. In einer kürzlich veröffentlichten Studie mit männlichen und weiblichen Mäusen (Aleksunes und Klaassen 2012) konnte durch einen prototypischen CYP2B-Induktor *in vivo* eine 2- bis 3-fache Steigerung der hepatischen CYP3A11-mRNA ausgelöst werden. Die Induktion blieb allerdings aus, wenn das Gen für den Transkriptionsfaktor CAR (verantwortlich für die PB-Wirkung) deletiert worden war. Außerdem war die konstitutive CYP3A11-Expression bei weiblichen Mäusen ohne PXR-Gen 1,5- bis 2-fach erhöht. Damit zeigt sich erneut die enge Verflechtung zwischen den verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Auch mit Ratten liegen Untersuchungsergebnisse in der Literatur vor. Martignoni et al. (2004), die bei Anwendung der real time RT-PCR keine Absolutwertbestimmung vornahmen, beschrieben eine 11-fache Steigerung der CYP3A1-mRNA durch PB *in vivo*, wobei jedoch eine etwas höhere Dosierung an männlichen Versuchstieren eingesetzt wurde als bei den eigenen Versuchen und

ebenfalls lediglich 3 Stichproben vorlagen. Bei Baldwin et al. (2006) wurde diese mRNA unter ähnlichen Bedingungen fast 5-fach durch PB erhöht. Wie lang dieser Induktionseffekt anhielt, wurde dort nicht untersucht. Bei einer CYP3A1-Induktion durch Dex in vivo war eine mRNA-Erhöhung zwar 24 Stunden nach der Vorbehandlung deutlich sichtbar, nach weiteren 24 Stunden aber schon verschwunden (Lieder 2007). Generell wurde auch für andere CYP-mRNA ein relativ schnelles Abklingen von in vivo ausgelösten Expressionssteigerungen in Leberschnitten gefunden (Stahmann 2003, Lerch 2008, Reinhardt 2009, Rohländer 2011).

Die CYP3A1-Induktion in vitro wurde nun also unter der Bedingung einer stark erhöhten CYP2B-Expression und einer leicht, aber anhaltend erhöhten CYP3A1-Basalaktivität ohne anhaltende CYP3A1-mRNA-Erhöhung untersucht. Es zeigte sich, dass trotzdem durch den Einsatz von 1 μ M Dex eine 5- bis 6-fache Aktivitätssteigerung der 2 β - und 15 β -TH gegenüber der Kontrollgruppe ohne Dex erzielt werden konnte (siehe Abbildung 5.3.) bei etwa doppelt so hohen Absolutwerten wie mit Leberschnitten unbehandelter Versuchstiere (siehe Abbildung 5.1.). Dieses Untersuchungsergebnis verdeutlicht, dass eine erhöhte CYP2B-Expression kein Hindernis für eine nachfolgende CYP3A1-Induktion darstellt. Das Induktionsprofil entspricht dem mit Leberschnitten unbehandelter Versuchstiere. Das Erreichen etwas geringerer Induktionsfaktoren stimmt mit der Erfahrung überein, dass die Induzierbarkeit bei höheren Basalwerten vermindert sein kann (Bjornsson et al. 2003). Die erhöhte CYP3A1-Basalaktivität war vor dem Zusatz von Dex bzw. in Kontrollschnitten ohne Dex-Exposition offenbar durch den Einfluss von PB in vivo ausgelöst worden (siehe oben). Damit wird deutlich, dass die alleinige Angabe von Induktionsfaktoren ohne Angabe von absoluten Aktivitäten keine zweifelsfreie Beurteilung von Versuchsergebnissen erlaubt.

Auch auf mRNA-Ebene wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der CYP3A1-Expression durch die Dex-Exposition nachgewiesen, indem Stichproben mit drei Dex-Konzentrationen aufgearbeitet wurden. Die Auswahl der beiden Konzentrationen 0,5 und 1 μ M Dex begründete sich durch den ersten deutlichen und signifikanten Anstieg der 2 β - und der 15 β -TH bei Einwirken der Grenzkonzentration von 0,5 μ M Dex, der sich durch 1 μ M Dex noch weiter steigern ließ (siehe Abbildung 5.3.). Der Befund steht in Einklang mit früheren Ergebnissen von Demirdag (2010), der Versuche unter ähnlichen Bedingungen durchführte. Auch dort wirkte eine Induktorkonzentration von 0,1 μ M Dex noch nicht induzierend, wohingegen 1 μ M deutlich

induzierende Eigenschaften besaß. Ein Vergleich der absoluten Gehalte an CYP3A1-spezifischer mRNA in Leberschnitten PB-behandelter (siehe Abbildung 5.4.), unbehandelter (siehe Abbildung 5.7. und Abbildung 5.9. sowie Demirdag 2010) und BNF-behandelter Tiere (Demirdag 2010) zeigt keine nennenswerten Unterschiede. Gewisse Schwankungen liegen im Fehlerbereich der Bestimmungsmethode. Die Induktionsfaktoren erreichten ebenfalls das gleiche Ausmaß wie bei Demirdag (2010). Somit scheint die mRNA-Ebene noch robuster gegenüber zusätzlicher Verschiebungen im CYP-Muster zu sein als die Enzymaktivitätsebene.

Eine ähnliche Abfolge von Versuchen, insbesondere die Kombination der Induktion mit PB in vivo und Dex in vitro, ist nicht in der Literatur beschrieben, jedoch wurden andere Induktorkombinationen untersucht, die ebenfalls nicht zu einer Behinderung der In-vitro-Induktion führten (Reinhardt 2009, Demirdag 2010, Rohländer 2011).

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass eine in vivo stattgefundene CYP2B-Induktion die sich in vitro anschließende CYP3A1-Induktion weder auf Enzymaktivitäts- noch auf der mRNA-Expressionsebene negativ beeinflusst. Somit kann Lebergewebe mit unbekanntem Expressionsstatus hinsichtlich CYP2B für In-vitro-Versuche zur Testung der CYP3A1-Induzierbarkeit ohne Einschränkungen verwendet werden.

6.3. Einfluss von PB in vitro auf die CYP3A1-Induktion durch Dex in Leberschnitten unbehandelter Ratten

In der vorliegenden Arbeit wurden reine In-vitro-Versuche durchgeführt, um planbare, kostengünstige In-vitro-Testungen von Prüfsubstanzen an Leberschnitten besser beurteilen zu können. Bestimmte Substanzkombinationen könnten die zu testende Funktion, hier die CYP3A-Induzierbarkeit, nur in vitro, aber nicht ex vivo beeinträchtigen. Dies galt es für die Kombination CYP2B-Induktor/CYP3A-Induktor zu prüfen. Damit sollte gezeigt werden, ob die reine In-vitro-Exposition beider Substanzen zu vergleichbaren Ergebnisse wie nach PB in vivo/Dex in vitro führt. Bei Verwendung von Versuchstiergewebe könnte damit eine In-vivo-Vorbehandlung gemäß Tierschutzgesetz eingeschränkt werden. Bei Verwendung von Humangewebe könnte die beabsichtigte Ex-vivo-Nutzbarkeit nach Substanzexposition in vivo vorab systematisch durch In-vitro-Versuche charakterisiert werden. Untersuchungen solcher

Zusammenhänge können hier nur in vitro vorgenommen werden, da eine gezielte Vorbehandlung wie im Tierversuch ethisch nicht vertretbar ist.

Im Folgenden soll diskutiert werden, ob an Präzisionsleberschnitten durch Interaktionen zwischen CYP3A- und 2B-Induktoren, modellhaft vertreten durch Dex und PB, Veränderungen der CYP3A-Induzierbarkeit in vitro hervorgerufen werden im Vergleich zum alleinigen Einsatz des CYP3A-Induktors (siehe Abschnitt 5.1.). Um Medikamenteninteraktionen mit schwachen und starken CYP2B-Induktoren zu simulieren, wurde PB in zwei Konzentrationen eingesetzt, wobei 5 μM noch keine CYP2B-induzierenden Eigenschaften aufweist und 100 μM PB in der Literatur als optimal induzierende Konzentration bewertet wird (Sidhu und Omiecinski 1995, Madan et al. 1999). Getrennt beobachtet wurden die CYP3A-Induktion gleichzeitig mit PB und nach vorher abgelaufener PB-Exposition in vitro.

6.3.1. Einfluss der Dex-Exposition in vitro gleichzeitig mit PB

Die Kontrolle und Dokumentation einer vorliegenden CYP2B-Induktion, unter deren Voraussetzung die gleichzeitige CYP3A1-Induktion zu testen war, erfolgte mittels PROD. Der Einsatz der niedrigen PB-Konzentration von 5 μM bewirkte erwartungsgemäß keine Steigerung der PROD (siehe Abbildung 5.5.). Auch in der Arbeit von Rohländer (2011) war bis zu einer Konzentration von 10 μM PB keine signifikante Aktivitätszunahme zu verzeichnen. Hingegen wurde bei Verwendung der hohen PB-Konzentration von 100 μM eine 7,5-fache Steigerung der CYP2B1-Induktion beobachtet. Dieser Wert war etwas höher als bei Rohländer (2011), die einen Faktor von 4 erreichte, und stimmt mit dem Ergebnis der Arbeiten von Stahmann (2003) und Lerch (2008) überein, die an Leberschnitten männlicher Tiere Faktoren von 7,6 bzw. 8 ermittelten. Somit war die Grundvoraussetzung einer vorliegenden CYP2B1-Induktion gewährleistet, da geklärt werden sollte, inwieweit diese Einfluss auf die CYP3A1-Induzierbarkeit hat.

Der in Abbildung 5.5. gezeigte zusätzliche Effekt von Dex auf die PROD stellt einen Nebenfund dar und soll daher hier nicht ausführlich diskutiert werden, denn die Untersuchung der CYP2B-Induktionsvorgänge war nicht der Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Dex scheint die PROD-Steigerung durch PB zu verstärken, ohne selbst CYP2B-induzierend zu wirken, vor allem bei niedriger PB-Konzentration mit geringerem CYP2B-Induktionspotential. Dies entspricht Befunden aus der Literatur,

wie bereits im Abschnitt 6.2. kurz und von Rohländer (2011) ausführlicher dargelegt wurde.

Im Unterschied zu einer ca. 4-fachen CYP3A-Aktivitätssteigerung durch PB in vivo (siehe Abschnitt 5.2.) bewirkten weder 5 noch 100 μ M PB in vitro während der 24-stündigen Leberschnitt-Inkubation eine nennenswerte Beeinflussung der absoluten 2 β - und 15 β -TH-Aktivitäten (siehe Abbildung 5.6. und 5.8.). Dieser Befund steht im Einklang mit Ergebnissen des Abschnitts 5.3.2. (siehe Abbildung 5.11. und 5.13.) sowie mit Untersuchungen von Rohländer (2011), die durch alleinigen Einsatz von 50 μ M PB keine signifikante Steigerung der 2 β -TH hervorrufen konnte. Desgleichen fanden Lupp et al. (2008) mit 100 μ M PB über 24 Stunden keine Veränderung der 2 β - und 15 β -TH in Leberschnitten männlicher Ratten. Auch bei Martignoni et al. (2004) wurde durch den Einsatz von 1 mM PB keine signifikante Steigerung der CYP3A-Aktivität beobachtet, wobei Leberschnitte männlicher Ratten für 48 Stunden inkubiert worden waren. Auf mRNA-Ebene hatte PB allein ebenfalls keine wesentliche Änderung der CYP3A1-Expression hervorgerufen (siehe Abbildung 5.7. und 5.9.), was Ergebnisse mit Rattenleberschnitten anderer Autoren (Martignoni et al. 2004, Meredith et al. 2003) bestätigen. Eine geringgradige Erhöhung durch 100 μ M PB bei zwei der drei untersuchten Stichproben könnte zwar als schwacher Effekt gedeutet werden, scheint aber eher im Fehlerbereich der Bestimmungsmethode (kompetitive RT-PCR) zu liegen. Der vernachlässigbare Effekt von PB auf die CYP3A1-mRNA in vitro an Leberschnitten männlicher Ratten (3-fach gesteigert) im Vergleich zur Wirkung in vivo (11-fache Steigerung), wie von Martignoni et al. (2004) beschrieben, steht daher im Einklang mit den Befunden auf Enzymaktivitätsebene. An Hepatozytenkulturen zeigten Saad et al. (1993), dass PB nur bei bestimmter Kulturmethode und nicht generell den CYP3A-Gehalt zu erhöhen (Verdoppelung) vermag. Es kann hier nur spekuliert werden, dass sich die Bedingungen für die PB-Wirkung in vivo von denen in vitro unterscheiden. Neben Differenzen in der Pharmakokinetik und in der Expositionsdauer (in vivo über 3 Tage) könnten auch die durch PB veränderte Proliferation oder die Zahl der vitalen, zur Induktion befähigten Leberzellen von Bedeutung sein. Der relativ geringe PB-Effekt in vivo auf die CYP-3A1-Expression im Unterschied zur starken CYP2B-Induktion ist möglicherweise deshalb nicht in vitro erreichbar, weil ein Teil der Zellen (vor allem im Schnittinneren) während der 24-stündigen Inkubation weniger am Stoffwechsel teilnimmt oder sogar abstirbt (Lupp et al. 2001, Neupert et al. 2003), die

verbleibenden Zellen aber stärker einer CYP2B-Induktion unterworfen sind, wodurch nicht genügend Ressourcen für eine CYP3A-Induktion über den PB-aktivierten Faktor CAR verbleiben. Eine CAR-Aktivierung ist aber für den PB-Effekt auf die CYP3A-mRNA notwendig (Aleksunes und Klaassen 2012). Dieser Sachverhalt stört offenbar nicht eine gleichzeitige CYP3A1-Induktion durch Dex (siehe Abbildungen 5.6. – 5.9.), die CAR-unabhängig über einen anderen Mechanismus abläuft (Waxman 1999, Pascussi et al. 2001).

Die konzentrationsabhängige Induktion der CYP3A-Aktivitäten durch Dex wurde durch simultane PB-Exposition in vitro nicht verändert. Die maximal erreichten 2 β - und 15 β -TH-Absolutwerte glichen denen bei alleiniger Dex-Einwirkung (vgl. Abbildungen 5.1., 5.6. und 5.8.). Während die Induktionsfaktoren bei gleichzeitiger In-vitro-Einwirkung von Dex mit der niedrigen PB-Konzentration ähnlich ausfielen wie bei alleiniger Einwirkung von Dex (vgl. Abschnitt 5.1., 5.3.1.2.1.), lagen hingegen bei der Kombination von Dex mit der hohen PB-Konzentration etwas geringere Induktionsfaktoren vor (siehe Abschnitt 5.3.1.3.1.). Begründet ist dies wahrscheinlich durch das Vorliegen geringgradig höherer Basalaktivitäten, die aber nicht ungewöhnlich waren und offenbar methodisch bedingt sind (generell sehr niedrige Aktivitäten an der Nachweisgrenze in Kontrollschnitten mit relativ starker Auswirkung kleiner Unterschiede auf die Faktoren). Alle Induktionsfaktoren lagen trotzdem in der gleichen Größenordnung. Auch in Leberschnitten ohne PB-Exposition waren mitunter etwas niedrigere Induktionsfaktoren durch Dex erzielt worden (Glöckner et al. 2008, Reinhardt 2009). Hieraus kann geschlossen werden, dass sich die gleichzeitige Einwirkung von Dex und PB in vitro nicht nachteilig auf die CYP3A-Enzymaktivitätsebene von Rattenleberschnitten auswirkt. Vergleichbare Versuchsanordnungen mit diesem In-vitro-System liegen in der Literatur nicht vor, wurden aber mit anderen Testsystemen beschrieben, von denen zwei Beispiele ausgewählt wurden. Monostory und Vereczkey (1993) beobachteten an Lebermikrosomen vergleichbare CYP3A1-Aktivitäten, unabhängig davon, ob die Versuchstiere mit Dex allein oder gleichzeitig in Kombination mit PB vorbehandelt worden waren. Jedoch wurden andere CYP3A1-spezifische Aktivitäten als die 2 β - und 15 β -TH ausgewertet. Ringel et al. (2002) erreichten durch gleichzeitige In-vitro-Behandlung mit Dex und PB deutlich gesteigerte Absolutwerte der 2 β - und 15 β -TH gegenüber dem alleinigen Einsatz eines dieser Modellinduktoren. Unter Einwirkung von 1 μ M Dex wurden Induktionsfaktoren von 33 und 18 für die 2 β - und 15 β -TH erreicht. Durch den

simultanen Einsatz von PB betrugen die Induktionsfaktoren hingegen 114 und 63 für die 2 β - und 15 β -TH. Jedoch kamen Hepatozytenkulturen und eine mit 750 μ M deutlich höhere PB-Konzentration während der dreitägigen Inkubationszeit zum Einsatz, weshalb ein direkter Vergleich nicht möglich ist.

Auch auf der mRNA-Ebene wirkte sich PB nicht störend auf die konzentrationsabhängige CYP3A1-Induktion aus, was anhand der kontinuierlichen Zunahme der Bandenbreite für das spezifische RT-PCR-Produkt erkennbar ist (siehe Abbildung 5.7. und 5.9.). Desgleichen zeigte sich nach Quantifizierung mittels RT-PCR bei beiden PB-Konzentrationen kein wesentlicher Einfluss auf die CYP3A1-mRNA-Expression. Vergleichbare Literatur mit Leberschnitten lag wiederum nicht vor. An Hepatozytenkulturen war eine CYP3A1-Induktion auf mRNA-Ebene (semiquantitativ bestimmt) durch 1 μ M Dex allein so stark, dass keine weitere Verbesserung mit PB in verschiedenen Konzentrationen ausgelöst werden konnte (Sidhu und Omiecinski, 1995); die fehlende oder minimale Induktion mit 0,01 oder 0,1 μ M Dex wurde dagegen durch 100 μ M PB etwas verstärkt. Möglicherweise war die in den eigenen Versuchen benutzte Konzentration von 0,5 μ M Dex auf mRNA-Ebene schon ausreichend stark induzierbar, so dass eine Verstärkung kaum noch erreicht werden konnte. Dafür sprechen die unter 6.1. diskutierten Literaturbefunde über Induktionsfaktoren der gleichen Größenordnung durch verschiedene, z. T. erheblich höhere Dex-Konzentrationen.

In Zusammenschau der Ergebnisse konnte belegt werden, dass sich die gleichzeitige Einwirkung von Dex und PB in vitro nicht nachteilig auf die CYP3A-Induzierbarkeit von Rattenleberschnitten auswirkt. Sowohl auf Enzymaktivitätsebene als auch auf der Ebene der CYP-mRNA-Expression konnte die konzentrationsabhängige Steigerung durch den Modellinduktor Dex ungehindert ablaufen. Dies deckt sich mit Befunden zu anderen Induktorkombinationen unter vergleichbaren Bedingungen, bei denen keine Störung der CYP1A1- und 2B1- und 3A1-Induktion durch gleichzeitige Exposition eines zweiten Induktors einer anderen Klasse beobachtet wurde (Reinhardt 2009, Rohländer 2011, Demirdag 2010).

6.3.2. Einfluss der Dex-Exposition in vitro nach vorangegangener PB-Exposition

In diesem Versuchsabschnitt sollte geklärt werden, inwieweit die sukzessive Einwirkung der beiden Induktoren für jeweils 24 Stunden in vitro die Ergebnisse der

In-vivo-/In-vitro-Versuche reproduzieren kann, da in diesem Fall eine Reduktion der Tierversuche durch reine In-vitro-Versuche zur Beurteilung der Biotransformation möglich wäre. Durch den sukzessiven Einsatz der Induktoren ergab sich eine Inkubationszeit von insgesamt 48 Stunden.

Analog zu den Kombinationsversuchen mit gleichzeitiger Induktorexposition erfolgte auch hier zunächst der Nachweis einer durch PB in vitro hervorgerufenen CYP2B-Induktion mittels Bestimmung der PROD (siehe Abbildung 5.10.). Es wurden die Aktivitäten nach 24- und 48-stündiger Inkubation ermittelt. Erwartungsgemäß führte die 24-stündige Inkubation mit 5 μ M PB nicht zu einer Steigerung der PROD-Aktivität, während durch 100 μ M PB ein deutlicher Anstieg zu beobachten war (horizontale Linien in Abbildung 5.10.). Das Ergebnis ist nahezu identisch mit demjenigen des Abschnitts 5.3.1. (siehe Abbildung 5.5.) und wurde bereits unter 6.3.1. hinreichend diskutiert. Desgleichen war der anschließende PROD-Abfall in den folgenden 24 Stunden ohne weitere Induktorexposition zu erwarten (Müller et al. 2000, Stahmann 2003, Lerch 2008, Lupp et al. 2008), wobei die Wirkung des initial eingesetzten PB auch nach anschließender PB-freier Inkubation für weitere 24 Stunden nicht vollständig abgeklungen war. Die Übereinstimmung mit den Befunden des Abschnitts 5.3.1. trifft gleichermaßen auf die konzentrationsabhängige Beeinflussung der PROD durch Dex zu, die offenbar als Verzögerung des Abklingens der PB-Induktion (siehe Abschnitt 6.3.1.) zu deuten ist, da Dex allein keine Steigerung der PROD bewirkt hatte und eine Verstärkung nachträglich (nach Ende der PB-Exposition) schwer vorstellbar wäre. Auch nach PB in vivo war die induzierte PROD etwas langsamer abgeklungen, wenn sich Dex im Inkubationsmedium befand. Trotzdem fielen die absoluten PROD-Aktivitäten nach 48-stündiger Inkubation generell niedriger aus als nach 24 Stunden (vgl. Abbildungen 5.5. und 5.10.), wobei sich 1 μ M Dex günstig auf den Erhalt der Gewebefunktionen in vitro auszuwirken scheint.

Wie bereits im Versuchsabschnitt mit gleichzeitiger Einwirkung der beiden Induktoren (siehe Abbildungen 5.6. und 5.8.) führten auch hier weder 5 noch 100 μ M PB während der 24-stündigen Präinkubation zu einer anhaltenden Induktion der CYP3A-spezifischen 2 β - und 15 β -TH (siehe Abschnitt 5.11. und 5.13.) im Unterschied zur vorangegangenen In-vivo-Behandlung mit PB (siehe Abschnitt 5.3.). Zwar sind in diesen Abbildungen nur die Aktivitäten nach 48 Stunden Inkubation zu finden, jedoch waren auch schon nach 24 Stunden PB-Exposition (vor Dex-Zusatz) keine Unterschiede zwischen den Gruppen ohne und mit PB vorhanden (nicht dargestellt). Die

ermittelten Aktivitäten lagen in vergleichbaren Größenordnungen wie bei anderen Autoren (siehe Abschnitt 6.3.1.). Somit musste sich bei diesen In-vitro-Versuchen die Dex-Wirkung nicht wie nach PB in vivo auf eine erhöhte CYP3A-Basalaktivität aufpfropfen (vgl. Abschnitt 6.2.), und auch auf mRNA-Ebene wurde weder unmittelbar nach der PB-Exposition (siehe Abschnitt 5.3.1., Abbildung 5.7. und 5.9.) noch nach weiteren 24 Stunden ohne PB (siehe Abbildung 5.12. und 5.14.) ein Einfluss von PB auf die CYP3A1-Expression sichtbar. Demzufolge war es nicht verwunderlich, dass sich bei diesen In-vitro-Versuchen die vorangegangene PB-Exposition nicht nachteilig auf die anschließende CYP3A1-Induktion durch Dex auswirkte.

Dass für die CYP3A1-abhängigen 2 β - und 15 β -TH-Aktivitäten etwas geringere Absolutwerte und Induktionsfaktoren ermittelt wurden als bei alleiniger Einwirkung von Dex in vitro über 24 Stunden (vgl. Abschnitt 5.11) und bei gleichzeitigem In-vitro-Einsatz der beiden Induktoren (vgl. Abschnitt 5.3.1.), ist offenbar der längeren Inkubationsdauer geschuldet und war unabhängig von der vorangegangenen PB-Exposition. Das Induktionsprofil mit konzentrationsabhängiger Steigerung durch Dex war unverändert nachweisbar (siehe Abbildung 5.11. und 5.13.) und entsprach Angaben aus der Literatur. Zum Vergleich erreichte Martignoni et al. (2004) bei der kontinuierlichen 48-stündigen Inkubation mit 100 μ M Dex bei der CYP3A-Aktivität ebenfalls einen Induktionsfaktor von 4, jedoch wurden Leberschnitte männlicher Ratten verwendet und zum Nachweis wurde die 6 β -TH bestimmt. Ursächlich für die erniedrigten Aktivitäten gegenüber den Versuchen mit 24-stündiger Inkubation könnten ein zeitabhängiger Verlust des energiespeichernden Glykogens (Gebhardt et al. 2003) und Hypoxie-Schäden in den zentral gelegenen Zellschichten sein, die in der Folge zu Koagulationsnekrosen oder zu herabgesetzter Stoffwechselaktivität in den minderversorgten Zellen der Gewebeschnitte führen könnten (Neupert et al. 2003, Lupp et al. 2001). Die zu erwartende Schädigung des Gewebes ist in der Regel nach 48-stündiger Inkubation größer als bei lediglich 24-stündiger Inkubation. Gleichzeitig könnte der zeitabhängige Verlust der basal vorhandenen bzw. durch PB induzierten CYP3A1-Enzyme zu diesem Effekt beitragen, da in der Literatur eine Enzymhalbwertszeit der CYP3A1-Proteine von 14 Stunden bei weiblichen Ratten in vivo angegeben wird (Watkins et al. 1986). Andererseits stimmten die etwas niedrigeren Induktionsfaktoren gut mit den Befunden nach In-vivo-Vorbehandlung mit PB (vgl. Abschnitt 5.2.) überein. Das Gleiche trifft für die mRNA-Ebene zu. Sowohl nach PB in vivo als auch in vitro war anschließend keine Veränderung der CYP3A1-

Induktion mit Dex in vitro zu verzeichnen. Der CYP3A1-mRNA-Gehalt war in allen Versuchsserien sehr ähnlich und die Induktionsfaktoren unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. In keinem Fall war eine Verschlechterung zu verzeichnen, eher deutete sich bei den Einzelwerten eine Begünstigung der CYP3A1-Induktion durch PB an (am ehesten nach 100 μ M PB). Die robuste CYP3A1-mRNA-Induzierbarkeit, die kaum durch andere Induktoren verändert wurde, war schon oben (siehe Abschnitt 6.2.) hervorgehoben worden. Außerdem kann vom Gehalt einer spezifischen mRNA als statische Größe nicht zwingend auf die spezifische Proteinsyntheserate als dynamische Größe geschlossen werden. Auch posttranskriptionelle Mechanismen können Verschiebungen verursachen. Schon Yuan et al. (1994) hatten festgestellt, dass eine CYP3A-Induktion ohne Veränderung des entsprechenden mRNA-Spiegels möglich ist. Gerade deshalb ist für klinische Belange der Nachweis einer Induktion auf Enzymaktivitätsebene bedeutsamer als auf mRNA-Ebene und wird als wichtigste Zielgröße für Induktionsstudien angesehen (Hewitt et al. 2007, Bjornsson et al. 2003). Da das Gesamtergebnis der unter 5.3.2. beschriebenen In-vitro-Versuche gut mit den Befunden der In-vivo-/In-vitro-Versuche (siehe Abschnitt 5.2.) übereinstimmt, erscheinen reine In-vitro-Versuche zur Prüfung der CYP3A-Induzierbarkeit sinnvoll, womit eine Grundvoraussetzung zur Einsparung von Tierversuchen erfüllt ist. Dies war auch schon für andere Induktorkombinationen festgestellt worden (Reinhardt 2009, Rohländer 2011, Demirdag 2010).

Insgesamt wird mit der vorliegenden Arbeit bestätigt, dass Präzisionsleberschnitte ein sehr gut geeignetes Modell zur Untersuchung der Biotransformation und deren Induktion sind, wie es auch in neuerer Literatur aufgezeigt wird (z. B. de Graaf et al. 2007, Fasinu et al. 2012). Eine CYP3A-Induktion durch Dex war sowohl auf der Aktivitäts- als auch auf der mRNA-Ebene uneingeschränkt möglich trotz vorheriger oder gleichzeitiger CYP2B-Induktion durch PB. Dabei wurde der Dex-Effekt nicht maskiert. Prinzipiell ist somit auch Gewebe für die Verwendung bei CYP3A-Induktionsversuchen geeignet, dessen Expressionszustand zuvor durch Einwirkung von CYP2B-Induktoren moduliert wurde, und von In-vitro-Versuchen mit entsprechenden Induktorkombinationen können vergleichbare Resultate erzielt werden. Ob die erhobenen Befunde auch für Humanleberschnitte gelten, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden.

7. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend können aus der vorliegenden Arbeit folgende Erkenntnisse gezogen werden:

1. Die In-vitro-Testung potentieller CYP3A-Induktoren, in der vorliegenden Arbeit Dex, ist in Leberschnitten von CYP2B-induzierten Spenderlebern nach PB in vivo uneingeschränkt möglich, sowohl auf der Aktivitäts- (2β - und 15β -TH) als auch auf der mRNA-Ebene. Das bedeutet, dass Lebergewebe mit unbekanntem CYP2B-Expressionszustand für Testungen der CYP3A-Induktion in vitro verwendet werden kann.
2. Die gleichzeitige Exposition von Rattenleberschnitten mit Dex und PB in vitro wirkt sich nicht nachteilig auf die CYP3A-Induzierbarkeit aus. Damit können Substanzen mit unbekannten Induktoreigenschaften auch dann auf ihr CYP3A-Induktionspotential getestet werden, wenn sie gleichzeitig CYP2B-induzierend wirken.
3. Die sukzessive Einwirkung von Dex nach PB in vitro an Leberschnitten ist qualitativ mit der Dex-Induktion an Schnitten ohne PB oder nach PB in vivo vergleichbar. Trotz etwas geringerer Absolutwerte der Enzymaktivitäten ist die Induzierbarkeit durch Dex in vitro sicher erkennbar und bleibt auf CYP3A1-mRNA-Ebene unverändert erhalten. Dies legt nahe, dass reine In-vitro-Versuche zumindest als Vortestung ausreichen, um den Einfluss der CYP2B-Expression auf die CYP3A-Induzierbarkeit in vitro zu prüfen und damit Tierversuche einzusparen oder Humangewebe einsetzen zu können.

Somit lässt sich konstatieren, dass Präzisionsleberschnitte ein geeignetes In-vitro-Modell zur Untersuchung der CYP3A1-Induktion durch Dex sind, auch unter dem Einfluss einer CYP2B-Induktion durch PB-Exposition.

8. Literaturverzeichnis

- Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke. 2009. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Zehnte Auflage. München: Urban & Fischer Verlag, 47-57.
- Alekseeva LI. 2004. Ecdysone 20-monooxygenase activity of cytochrome P450 in plants and cell culture of *Ajuga reptans* L. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 40(2):159-164.
- Aleksunes LM, Klaassen CD. 2012. Coordinated Regulation of Hepatic Phase-I and -II Drug Metabolizing Genes and Transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPAR α -, and Nrf2-null mice. *Drug Metab Dispos*, 40(7):1366-1379.
- Aouabdi S, Gibson G, Plant N. 2006. Transcriptional regulation of the PXR gene: identification and characterization of a functional peroxisome proliferator-activated receptor alpha binding site within the proximal promoter of PXR. *Drug Metab Dispos*. 34(1):138-144.
- Baldwin SJ, Bramhall JL, Ashby CA, Yue L, Murdock PR, Hood SR, Ayrton AD, Clarke SE. 2006. Cytochrome P450 gene induction in rats ex vivo assessed by quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (TaqMan). *Drug Metab Dispos*, 34(6):1063-1069.
- Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ. 1991. Isolated hepatocytes, preparation, properties and applications in Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B.V., 272-274.
- Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King PS, Miwa G, Ni L, Kumar G, McLeod J, Obach RS, Roberts S, Roe A, Shah A, Snikeris F, Sullivan JT, Tweedie D, Vega JM, Walsh J, Wrighton SA. 2003. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug Interaction studies: a pharmaceutical research and manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab Dispos*, 31(7):815-832.
- Boess F, Kamber M, Romer S, Gasser R, Müller D, Albertini S, Suter L. 2003. Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. *Toxicol Sci*, 73(2):386-402.

- Bogaards JJ, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn MJ, Weaver RJ, van Bladeren PJ, Walther B. 2000. Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica*, 30(12):1131-1152.
- Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. 2003. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol*, 189 (3):233-246.
- Constan AA, Sprankle CS, Peters JM, Kedderis GL, Everitt JI, Wong BA, Gonzalez FL, Butterworth BE. 1999. Metabolism of chloroform by cytochrome P450 2E1 is required for induction of toxicity in the liver, kidney, and nose of male mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 160(2):120-126.
- Correia MA, Liao M. 2007. Cellular proteolytic systems in P450 degradation: evolutionary conservation from *Saccharomyces cerevisiae* to mammalian liver. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 3(1):33-49.
- Cui X, Thomas A, Han Y, Palamanda J, Montgomery D, White RE, Morrison RA, Cheng KC. 2005. Quantitative PCR assay for cytochromes P450 2B and 3A induction in rat precision-cut liver slices: correlation study with induction in vivo. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 52(2):234-243.
- de Graaf IA, Draaisma AL, Schoeman O, Fahy GM, Groothuis GM, Koster HJ. 2007. Cryopreservation of rat precision-cut liver and kidney slices by rapid freezing and vitrification. *Cryobiology*, 54(1):1-12.
- de Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, van den Anker JN. 1999. Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet*, 37(6):485-505.
- Demirdag T. 2010. Der Einfluss einer CYP1A1-Induktion durch Beta-Naphthoflavin auf die CYP3A1-Induzierbarkeit in vitro durch Dexamethason an Rattenleberschnitten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Dogterom P. 1993. Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. *Drug Metab Dispos*, 21(4):699-704.
- Drobner C, Glöckner R, Müller D. 2000. Optimal oxygen tension conditions for viability and functioning of precision-cut liver slices. *Exp Toxicol Pathol*, 52 (4):335-338.

- Efferth T. 2006. Molekulare Pharmakologie und Toxikologie: Biologische Grundlagen von Arzneimitteln und Giften. Erste Auflage. Berlin: Springer.
- Eichelbaum M, Burk O. 2001. CYP3A genetics in drug metabolism. *Nat Med*, 7(3): 285-287.
- Ekins S. 1996. Past, present, and future applications of precision-cut liver slices for in vitro xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev*, 28(4):591-623.
- Ekins S, Ring BJ, Grace J, McRobie-Belle DJ, Wrighton SA. 2000. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 44(1):313-324.
- Fasinu P, Bouic PJ, Rosenkranz B. 2012. Liver-based in vitro technologies for drug biotransformation studies - a review. *Curr Drug Metab*, 13(2):215-224.
- Fisher RL, Gandolfi AJ, Brendel K. 2001. Human liver quality is a dominant factor in the outcome of in vitro studies. *Cell Biol Toxicol*, 17(3):179-189.
- Fukuda H, Fujii T, Daimon H, Iwata M, Ogawa T, Tanase S, Morino Y. 1993. Purification and characterization of cytochrome P450 from an isobutene-forming microorganism, *Rhodotorula minuta*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 57(9):1599-1601.
- Garfinkel D. 1958. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys*, 77(2):493-509.
- Gebhardt R, Hengstler JG, Müller D, Glöckner R, Buenning P, Laube B, Schmelzer E, Ullrich M, Utesch D, Hewitt N, Ringel M, Hilz BR, Bader A, Langsch A, Koese T, Burger HJ, Maas J, Oesch F. 2003. New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab Rev*, 35(2-3):145-213.
- Gellner K, Eiselt R, Hustert E, Arnold H, Koch I, Haberl M, Deglmann CJ, Burk O, Buntfuss D, Escher S, Bishop C, Koebe HG, Brinkmann U, Klenk HP, Kleine K, Meyer UA, Wojnowski L. 2001. Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics*, 11(2):111-121.

- Gibson GG, Plant NJ, Swales KE, Ayrton A, El-Sankary W. 2002. Receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man. *Xenobiotica*, 32(3):165-206.
- Giese B, Giese T. 1990. Altersabhängigkeit und Induzierbarkeit der Biotransformation von Methoxy-, Ethoxy-, Propoxy-, Butoxy-, Pentoxy- und Phenylmethoxycoumarin in der Rattenleber [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Gillette JR. 1963. Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic mechanism. *Fortschritte der Arzneimittelforschung*. Basel; Stuttgart: Birkhäuser-Verlag.
- Glöckner R, Lieder A, Lupp A. 2008. Determination of CYP activity in precision-cut liver slices: whether to use intact slices or slice homogenate. *Anal Bioanal Chem*, 392(6):1167-1172.
- Glöckner R, Steinmetzer P, Drobner C, Müller D. 1999. Use of Fresh and Cryopreserved Human Liver Slices in Toxicology with Special Reference to In Vitro Induction of Cytochrome P450. *Toxicol In Vitro*, 13(4-5):531-535.
- Glöckner R, Steinmetzer P, Lupp A, Danz M, Müller D. 2002. In vitro induction of cytochrome P450 2B1- and 3A1-mRNA and enzyme immunostaining in cryopreserved precision-cut rat liver slices. *Toxicology*, 176(3):187-93.
- Glöckner R, Sünkel E, Steinmetzer P and Müller D. 2001. Influence of different CYP1A1-mRNA expression states after induction in vivo on subsequent inducibility in vitro in rat liver slices. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 363 S:R164.
- Glöckner R, Wagener J, Lieder A. 2003. In vitro induction of cytochrome P4503A1-mRNA and testosterone hydroxylation in precision-cut liver slices from male and female rats. *Exp Toxicol Pathol*, 54(5-6):411-415.
- Gokhale MS, Bunton TE, Zurlo J, Yager JD. 1997. Cytochrome P450 isoenzyme activities in cultured rat and mouse liver slices. *Xenobiotica*, 27(4):341-355.
- Gonzalez FJ. 1988. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev*, 40(4):243-288.

- Gonzalez FJ, Nebert DW. 1990. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet*, 6(6):182-186.
- Gonzalez FJ, Nebert DW, Hardwick JP, Kasper CB. 1985. Complete cDNA and protein sequence of a pregnenolone 16 alpha- carbonitrile-induced cytochrome P-450. A representative of a new gene family. *J Biol Chem*, 260(12):7435-7441.
- Gonzalez FJ, Song BJ, Hardwick JP. 1986. Pregnenolone 16 alpha-carbonitrile-inducible P-450 gene family: gene conversion and differential regulation. *Mol Cell Biol*, 6(8):2969-2976.
- Goodwin B, Redinbo MR, Kliewer SA. 2002. Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42:1-23.
- Groneberg DA, Grosse-Siestrup C, Fischer A. 2002. In vitro models to study hepatotoxicity. *Toxicol Pathol*, 30(3):394-399.
- Guengerich FP. 1999. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 39:1-17.
- Handschin C, Meyer UA. 2003. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, 55(4):649-673.
- Hewitt NJ, de Kanter R, LeCluyse E. 2007. Induction of drug metabolizing enzymes: a survey of in vitro methodologies and interpretations used in the pharmaceutical industry--do they comply with FDA recommendations? *Chem Biol Interact*, 168(1):51-65.
- Honkakoski P, Negishi M. 2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J*, 347(Pt 2): 321–337.
- Huss JM, Wang SI, Astrom A, McQuiddy P, Kasper CB. 1996. Dexamethasone responsiveness of a major glucocorticoid-inducible CYP3A gene is mediated by elements unrelated to a glucocorticoid receptor binding motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(10):4666-4670.
- Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB, Hamilton GA, McKee DD, Tomkinson NC, LeCluyse EL, Lambert MH, Willson TM, Kliewer SA, Moore JT. 2000. The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol*, 14(1):27-39.

- Khan AA, Chow EC, van Loenen-Weemaes AM, Porte RJ, Pang KS, Groothuis GM. 2009. Comparison of effects of VDR versus PXR, FXR and GR ligands on the regulation of CYP3A isozymes in rat and human intestine and liver. *Eur J Pharm Sci*, 37(2):115-125.
- Klingenberg M. 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 75(2):376-386.
- Klinger W, Mueller D. 1974. The influence of age on the protein concentration in serum, liver and kidney of rats determined by various methods. *Z Versuchstierkd*, 16(2):149-153.
- Krumdieck CL, dos Santos JE, Ho KJ. 1980. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal Biochem*, 104(1):118-123.
- Laishes BA, Williams GM. 1976. Conditions affecting primary cell cultures of functional adult rat hepatocytes. II. Dexamethasone enhanced longevity and maintenance of morphology. *In Vitro*, 12(12):821-832.
- Lake BG, Ball SE, Renwick AB, Tredger JM, Kao J, Beamand JA, Price RJ. 1997. Induction of CYP3A isoforms in cultured precision-cut human liver slices. *Xenobiotica*, 27(11):1165-1173.
- Lake BG, Beamand JA, Japenga AC, Renwick A, Davies S, Price RJ. 1993. Induction of cytochrome P450-dependent enzyme activities in cultured rat liver slices. *Food Chem Toxicol*, 31(5):377-386.
- Lambert CB, Spire C, Claude N, Guillouzo A. 2009. Dose- and time-dependent effects of phenobarbital on gene expression profiling in human hepatoma HepaRG cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 234(3):345-360.
- Larsen MC, Brake PB, Parmar D, Jefcoate CR. 1994. The induction of five rat hepatic P450 cytochromes by phenobarbital and similarly acting compounds is regulated by a sexually dimorphic, dietary-dependent endocrine factor that is highly strain specific. *Arch Biochem Biophys*, 315(1):24-34.
- Lee SJ, Goldstein JA. 2005. Functionally defective or altered CYP3A4 and CYP3A5 single nucleotide polymorphisms and their detection with genotyping tests. *Pharmaco-genomics*, 6(4):357-371.
- Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA. 1998. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate

- CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest*, 102(5): 1016-1023.
- Lerch C. 2008. Einfluss veränderter CYP2B1-Aktivität und -mRNA-Expression nach Induktion in vivo auf die nachfolgende Induzierbarkeit in vitro an Rattenleberschnitten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Lerche-Langrand C, Toutain HJ. 2000. Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology*, 153(1-3):221-253.
- Li AP, Kaminski DL, Rasmussen A. 1995. Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology*, 104(1-3):1-8.
- Lieder A. 2007. Veränderung der CYP3A-Expression und -Aktivität an Rattenleberschnitten nach Induktion in vivo und in vitro [Dissertation]. Jena: Friedrich Schiller-Universität.
- Lindley C, Hamilton G, McCune JS, Faucette S, Shord SS, Hawke RL, Wang H, Gilbert D, Jolley S, Yan B, LeCluyse EL. 2002. The effect of cyclophosphamide with and without dexamethasone on cytochrome P450 3A4 and 2B6 in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 30 (7):814-822.
- Lupp A, Danz M, Müller D. 2001. Morphology and cytochrome P450 isoforms expression in precision-cut rat liver slices. *Toxicology*, 161 (1-2):53-66.
- Lupp A, Glöckner R, Danz M, Müller D. 2002. Cryopreserved precision-cut rat liver slices: morphology and cytochrome P450 isoforms expression after prolonged incubation. *Toxicol In Vitro*, 16 (6):749-758.
- Lupp A, Glöckner R, Etzrodt J, Müller D. 2008. Precision-cut liver slices from rats of different ages: basal cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and inducibility. *Anal Bioanal Chem*, 392(6):1173-1184.
- Madan A, Dehaan R, Mudra D, Carroll K, Lecluyse E, Parkinson A. 1999. Effect of cryopreservation on cytochrome P-450 enzyme induction in cultured rat hepatocytes. *Drug Metab and Dispos*, 27(3):327-335.
- Mahnke A, Strotkamp D, Roos PH, Hanstein WG, Chabot GG, Nef P. 1997. Expression and inducibility of cytochrome P450 3A9 (CYP3A9) and other members of the CYP3A subfamily in rat liver. *Arch Biochem Biophys*, 337(1):62-68.

- Martignoni M, de Kanter R, Grossi P, Mahnke A, Saturno G, Monshouwer M. 2004. An in vivo and in vitro comparison of CYP induction in rat liver and intestine using slices and quantitative RT-PCR. *Chem Biol Interact*, 151 (1):1-11.
- Matsubara T, Kim HJ, Miyata M, Shimada M, Nagata K, Yamazoe Y. 2004. Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 309(3):1282-1290.
- McCune JS, Hawke RL, LeCluyse EL, Gillenwater HH, Hamilton G, Ritchie J, Lindley C. 2000. In vivo and in vitro induction of human cytochrome P4503A4 by dexamethasone. *Clin Pharmacol Ther*, 68(4):356-66.
- Meredith C, Scott MP, Renwick AB, Price RJ, Lake BG. 2003. Studies on the induction of rat hepatic CYP1A, CYP2B, CYP3A and CYP4A subfamily form mRNAs in vivo and in vitro using precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica*, 33 (5):511-527.
- Meunier V, Bourrié M, Julian B, Marti E, Guillou F, Berger Y, Fabre G. 2000. Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow-up. *Xenobiotica*, 30(6):589-607.
- Meyer UA. 1996. Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm*, 24(5):449-459.
- Monostory K, Vereczkey L. 1993. Combined action of phenobarbital and dexamethasone on the activity of rat liver P450 system. *Acta Pharm Hung*, 63(5):296-300.
- Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, Goodwin B, Liddle C, Blanchard SG, Willson TM, Collins JL, Kliewer SA. 2000. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem*, 275(20): 15122-7.
- Müller D. 1990. Influence of xenobiotics on drug metabolism and its sensitive detection. *Exp Pathol*, 39(3-4):187-194.
- Müller D, Steinmetzer P, Pissowotzki K, Glöckner R. 2000. Induction of cytochrome P450 2B1-mRNA and pentoxyresorufin O-depentylation after exposure of precision-cut rat liver slices to phenobarbital. *Toxicology*, 144(1-3):93-97.

- Nagata K, Gonzalez FJ, Yamazoe Y, Kato R. 1990. Purification and characterization of four catalytically active testosterone 6 beta-hydroxylase P-450s from rat liver microsomes: comparison of a novel form with three structurally and functionally related forms. *J Biochem*, 107(5):718-725.
- Nagata K, Murayama N, Miyata M, Shimada M, Urahashi A, Yamazoe Y, Kato R. 1996. Isolation and characterization of a new rat P450 (CYP3A18) cDNA encoding P450(6)beta-2 catalyzing testosterone 6 beta- and 16 alpha-hydroxylations. *Pharmacogenetics*, 6(1):103-111.
- Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W. 1987. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA*, 6(1):1-11.
- Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF. 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol*, 10(1):1-14.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6(1):1-42.
- Neupert D, Glöckner R, Neupert G, Müller D. 2003. Ultrastructural changes in hepatocytes of precision-cut rat liver slices after incubation for 24 and 48 hours. *Exp Toxicol Pathol*, 54 (5-6):481-488.
- Olinga P, Merema M, Hof IH, de Jong KP, Slooff MJ, Meijer DK, Groothuis GM. 1998a. Effect of human liver source on the functionality of isolated hepatocytes and liver slices. *Drug Metab Dispos*, 26(1):5-11.
- Olinga P, Merema M, Hof IH, Slooff MJ, Proost JH, Meijer DK, Groothuis GM. 1998b. Characterization of the uptake of rocuronium and digoxin in human hepatocytes: carrier specificity and comparison with in vivo data. *J Pharmacol Exp Ther*, 285 (2):506-510.
- Parkinson A. 1996. An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. *Toxicol Pathol*, 24(1):48-57.

- Pascussi JM, Drocourt L, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ. 2001. Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *Eur J Biochem*, 268 (24):6346-6358.
- Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H. 2008. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol*, 82(10):667-715.
- Persson KP, Ekehed S, Otter C, Lutz ES, McPheat J, Masimirembwa CM, Andersson TB. 2006. Evaluation of human liver slices and reporter gene assays as systems for predicting the cytochrome p450 induction potential of drugs in vivo in humans. *Pharm Res*, 23(1):56-69.
- Pohl RJ, Fouts JR. 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal Biochem*, 107(1):150-155.
- Reinhardt M. 2009. Einfluss von Dexamethason auf die CYP1A1-Induktion in vitro durch den Modellinduktor Beta-Naphthoflavon (BNF) an Rattenleberschnitten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Ringel M, Oesch F, Gerl M, Klebach M, Quint M, Bader A, Böttger T, Hengstler JG. 2002. Permissive and suppressive effects of dexamethasone on enzyme induction in hepatocyte co-cultures. *Xenobiotica*, 32(8):653-666.
- Rohländer S. 2011. Einfluss von Dexamethason auf die CYP-Induktion durch den Modellinduktor Phenobarbital an Rattenleberschnitten in vitro [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Saad MJ, Folli F, Araki E, Hashimoto N, Csermely P, Kahn CR. 1994. Regulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-F442A adipocytes. Effects of differentiation, insulin, and dexamethasone. *Mol Endocrinol*, 8(5):545-557.
- Saad MJ, Folli F, Kahn JA, Kahn CR. 1993. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest*, 92(4):2065-2072.
- Schuetz EG, Guzelian PS. 1984. Induction of cytochrome P-450 by glucocorticoids in rat liver. II. Evidence that glucocorticoids regulate induction of cytochrome P-450 by a nonclassical receptor mechanism. *J Biol Chem*. 259(3):2007-2012.

- Sidhu JS, Omiecinski CJ. 1995. Modulation of xenobiotic-inducible cytochrome P450 gene expression by dexamethasone in primary rat hepatocytes. *Pharmacogenetics*, 5(1):24-36.
- Silva JM, Morin PE, Day SH, Kennedy BP, Payette P, Rushmore T, Yergey JA, Nicoll-Griffith DA. 1998. Refinement of an in vitro cell model for cytochrome P450 induction. *Drug Metab Dispos*, 26(5):490-496.
- Stahmann N. 2003. In-vitro-Induktion der 7-Pentoxoresorufin-O-Depentylierung und von Cytochrom-P450-2B1-mRNA in Präzisionsleberschnitten Phenobarbitalvorbe-handelter Ratten [Diplomarbeit]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Stanley LA, Horsburgh BC, Ross J, Scheer N, Wolf CR. 2006. PXR and CAR: nuclear receptors which play a pivotal role in drug disposition and chemical toxicity. *Drug Metab Rev*, 38:515-597.
- Strotkamp D, Roos PH, Hanstein WG. 1995. A novel CYP3 gene from female rats. *Biochim Biophys Acta*, 1260(3):341-344.
- Surry DD, McAllister G, Meneses-Lorente G, Evans DC. 1999. High throughput ribonuclease protection assay for the determination of CYP3A mRNA induction in cultured rat hepatocytes. *Xenobiotica*, 29(8):827-838.
- Wang H, Kawashima H, Strobel HW. 1996. cDNA cloning of a novel CYP3A from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 221(1):157-162.
- Wanke I, Schwarz M, Buchmann A. 2004. Insulin and dexamethasone inhibit TGF-beta-induced apoptosis of hepatoma cells upstream of the caspase activation cascade. *Toxicology*, 204(2-3):141-154.
- Warburg O. 1923. Versuche an überlebendem Karzinomgewebe. *Biochem Z*, 142:317-333.
- Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Maurel P, Guzelian PS. 1986. Macrolide antibiotics inhibit the degradation of the glucocorticoid-responsive cytochrome P-450p in rat hepatocytes in vivo and in primary monolayer culture. *J Biol Chem*, 261(14):6264-6271.
- Wauthier V, Verbeeck RK, Buc Calderon P. 2004. Age-related changes in the protein and mRNA levels of CYP2E1 and CYP3A isoforms as well as in their hepatic activities in Wistar rats. What role for oxidative stress? *Arch Toxicol*, 78(3):131-138.

- Waxman DJ. 1999. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys*, 369(1):11-23.
- Waxman DJ, Morrissey JJ, Naik S, Jauregui HO. 1990. Phenobarbital induction of cytochromes P-450. High-level long-term responsiveness of primary rat hepatocyte cultures to drug induction, and glucocorticoid dependence of the phenobarbital response. *Biochem J*, 271(1):113-119.
- Whysner J, Ross PM, Williams GM. 1996. Phenobarbital mechanistic data and risk assessment: enzyme induction, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. *Pharmacol Ther*, 71 (1-2):153-191.
- Yamada H, Ishii Y, Yamamoto M, Oguri K. 2006. Induction of the hepatic cytochrome P450 2B subfamily by xenobiotics: research history, evolutionary aspect, relation to tumorigenesis, and mechanism. *Curr Drug Metab*, 7 (4):397-409.
- Yamamoto Y, Moore R, Goldsworthy TL, Negishi M, Maronpot RR. 2004. The orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice. *Cancer Res*, 64 (20):7197-7200.
- Yamazaki H, Inui Y, Wrighton SA, Guengerich FP, Shimada T. 1995. Procarcinogen activation by cytochrome P450 3A4 and 3A5 expressed in *Escherichia coli* and by human liver microsomes. *Carcinogenesis* 16(9):2167-2170.
- Yuan W, Cawley GF, Eyer CS, Backes WL. 1994. Induction of P450 3A by ethylbenzene without altering RNA levels. *Biochem Biophys Res Commun*, 202(3):1259-1265.
- Zucker AJ, Gibson GG, Jones B, Dickins M, Plant N. 2006. Species differences in the induction and activation of the pregnane X receptor (PXR). *Toxicology*, 226:40-41.

9. Anhang

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich herzlich bei Frau PD Dr. med. R. Glöckner für die Bereitstellung des Themas, die kompetente Hilfe bei der Planung und Auswertung der Versuche sowie für die wertvollen Hinweise und die Geduld bei der Niederschrift dieser Arbeit.

Ein weiterer herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Müller für seine freundliche Unterstützung, die konstruktiven Anmerkungen zum Manuskript und die aufschlussreichen Gespräche in der Zeit der Anfertigung der Versuchsreihen.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Frau Guder bedanken, die mir bei der praktischen Durchführung der Versuche mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ohne das Verständnis und die moralische Unterstützung meines Mannes wäre mir die Fertigstellung dieser Arbeit nach dem Studium in meinen ersten Arbeitsjahren kaum gelungen. Deshalb sei ihm und meiner vierjährigen Tochter Nina an dieser Stelle ebenfalls herzlich gedankt.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sabine Hempel, geb. Bückner
Geburtsdatum: 27. Dezember 1981
Geburtsort: Mühlhausen/Thüringen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet
Ehemann: Dr. med. dent. Wolfgang Georg Hempel
Kind: Nina Angelika Hempel, geb. 12. Januar 2008

Schulbildung:

1988 – 1992 Grundschole: Martinischule, Mühlhausen/Thüringen
1992 – 1998 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Mühlhausen/Thüringen
1998 – 2000 Käthe-Kollwitz-Gymnasium, Lengenfeld unterm Stein
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

10/2000 – 04/2007 Studium der Humanmedizin an der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

09/2002 Ärztliche Vorprüfung
09/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2007 Ärztliche Prüfung
05/2007 Approbation als Ärztin

Beruf:

Seit 07/2007 Assistenzärztin der I. Medizinischen Klinik des Hegau-
Bodensee-Klinikums in Singen (Hohentwiel)

3/2008 – 3/2009 Elternzeit

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. Reinhild Glöckner, Prof. Dr. med. D. Müller,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Gottmadingen, 15. Juni 2012

Sabine Hempel